

**Vergleichende Untersuchungen
über das Renin-Angiotensin-System im Plasma und
in mikrodisezierten Glomeruli der Ratte**

Stella Salama

1980

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München

Vorstand: Professor Dr. K. Thurau

Vergleichende Untersuchungen über das Renin-Angiotensin-System
im Plasma und in mikrodisssezierten Glomeruli der Ratte

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Stella Salama

aus

Istanbul

1980

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Dahlheim

Mitberichterstatter: Prof. Dr. K. Thureau

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 6.11.1980



INHALTSVERZEICHNIS

Verwendete Abkürzungen

A. Einleitung und Problemstellung	1
B. Methoden	8
a. Präparative Anreicherung eines Ratten-Renin-substrates	8
b. Herkunft und Herstellung der verwendeten Reninpräparationen	9
c. Zusammensetzung der für die Reninbestimmung im RIA erforderlichen Lösungen	10
I. Aktivitäts- bzw. Konzentrationsbestimmung der Komponenten des RAS im Plasma	13
1. Plasma-Reninaktivität (PRA)	13
2. Plasma-Renin,,konzentration" (PRC)	24
3. Plasma-Reninsubstratkonzentration (PRSC)	27
4. Plasma-Converting enzyme-Aktivität (PCEA)	40
5. Plasma-Angiotensinase-Aktivität (PaseA)	44
II. Aktivitäts- bzw. Konzentrationsbestimmung der Komponenten des RAS in mikrodisssezierten Glomeruli	47
a. Isolierung der mikrodisssezierten Glomeruli	47
b. Messung der Enzymaktivitäten bzw. -konzentrationen	48
1. Glomerulärer Reningehalt	48
2. Glomeruläre Converting enzyme-Aktivität (GCEA)	48
3. Glomeruläre Angiotensinase-Aktivität (GaseA)	50
C. Ergebnisse und Diskussion	53
I. Das Plasma- und glomeruläre RAS von unbehandelten Ratten (Kontrollen)	53
II. Das Verhalten des Plasma- und glomerulären RAS nach Applikation des Angiotensin II-Antagonisten Saralasin (Sar-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Ala)	66
III. Das Plasma- und glomeruläre RAS bei Ratten mit genetisch bedingtem Hochdruck	84
IV. Schlußbemerkung	89
D. Zusammenfassung	90
E. Literatur	92

Verwendete Abkürzungen

A I	Angiotensin I
A II	Angiotensin II
CE	Converting enzyme
EZV	Extrazellulärvolumen
GAseA	Glomeruläre Angiotensinase-Aktivität
GCEA	Glomeruläre Converting enzyme-Aktivität
GR	Glomerulärer Reningehalt
JGA	Juxtaglomerulärer Apparat
PAseA	Plasma-Angiotensinase-Aktivität
PCEA	Plasma-Converting enzyme-Aktivität
PRA	Plasma-Reninaktivität
PRC	Plasma-Renin„konzentration“
PRSC	Plasma-Reninsubstratkonzentration
RAS	Renin-Angiotensin-System
RIA	Radioimmunoassay
RR	Blutdruck
RS	Reninsubstrat
RSC	Reninsubstratkonzentration

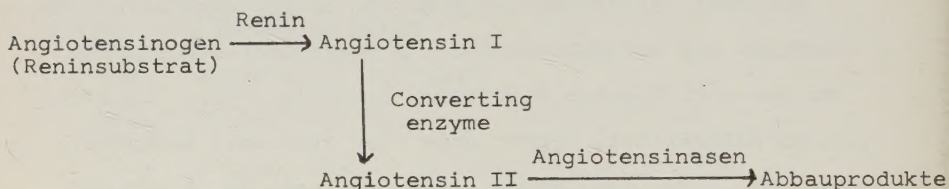
A. Einleitung und Problemstellung

Das Renin-Angiotensin-System ist an der Regulation des Natrium- und Wasserhaushalts und wahrscheinlich auch an der des systemischen Blutdrucks beteiligt (40). Es wird durch Salzverlust, Hypovolämie oder Hypotonie aktiviert (40, 58). Bei bestimmten Formen des renalen Hochdrucks stellt das RAS einen wichtigen pathogenetischen Faktor dar.

Bislang wird das Verhalten der Komponenten des RAS hauptsächlich im Plasma oder, wenn experimentell möglich, in der Gesamtniere untersucht. Nur in einzelnen Fällen wurde die Reninaktivität im glomerulären Bereich, dem Syntheseort des Enzyms, gemessen (9, 10, 22, 26, 68, 69). Das Renin wird vorwiegend in der Media der afferenten glomerulären Arteriolen gebildet und gespeichert. Es wird angenommen, daß das RAS an der Regulation der Nierendurchblutung und der glomerulären Filtration beteiligt ist, indem es auf den Gefäßwiderstand der glomerulären Arteriolen einwirkt.

Renin spaltet aus dem Reninsubstrat Angiotensinogen, einem Glykoprotein der α_2 -Globulinfraktion, das Dekapeptid Angiotensin I ab, das in einer folgenden durch das Converting enzyme katalysierten Reaktion unter Abspaltung des Dipeptids His-Leu in das Oktapeptid Angiotensin II

übergeht. Dieses wird durch unspezifische Peptidasen (Angiotensinasen) abgebaut.



A II ist die wichtigste physiologisch aktive Komponente des RAS und die wirksamste aller bekannten vasoaktiven Substanzen. A II steigert den arteriellen Blutdruck 4-8mal stärker als Noradrenalin (30). Es wirkt nicht nur an der glatten Muskulatur der Gefäße, sondern u.a. auch an der des Uterus und des Darmes (32).

Am Herzen hat A II einen positiv inotropen Effekt (23, 39), in der Nebennierenrinde stimuliert es die Aldosteronsekretion (25, 29, 42) und im Nebennierenmark vermutlich auch die Katecholaminfreisetzung (19, 20, 51). Die Ausschüttung des antidiuretischen Hormons aus dem Hypophysenhinterlappen (45) und die Freisetzung von Acetylcholin (50) und Noradrenalin (49) aus den ganglionären Fasern des vegetativen Nervensystems sollen ebenfalls von A II beeinflusst werden. Außerdem wird eine Einwirkung des A II auf die tubuläre Na-Rückresorption (47, 63) und die glomeruläre Proteinpermeabilität diskutiert (17).

Eine Aktivierung der renalen Reninfreisetzung wird unter Beteiligung folgend genannter Strukturen angenommen:

- a. Barorezeptoren in den glomerulären afferenten Arteriolen,
- b. NaCl-sensitive Rezeptoren an den Macula densa-Zellen am beginnenden distalen Tubulus,
- c. Volumenrezeptoren im extrazellulären Raum,
- d. renales sympathisches Nervensystem.

Auf diese Theorien soll nachfolgend eingegangen werden (3,16,79).

ad a) Barorezeptoren-Theorie:

Tobian (71,72,74) nimmt an, daß die glomerulären afferenten Arteriolen Barorezeptoren enthalten, die bei einem Blutdruckanstieg mit der Arteriolenwandung gedehnt werden, was zu einer Verminderung der Reninfreisetzung führt; dagegen steigert ein erniedrigter arterieller Druck die Reninausschüttung (15,59). Da an den glomerulären Arteriolen der Blutdruckabfall (Widerstandszunahme) am höchsten ist, sollte die Anlage des Renins in diesen Gefäßwandungen aufgrund des Hagen-Poiseuilleschen Gesetzes sehr sinnvoll sein.

ad b) Macula densa-Theorie:

Die Abhängigkeit der Reninfreisetzung von der Zusammensetzung der Tubulusflüssigkeit (27, 28), insbesondere der NaCl-Konzentration in Höhe der Macula densa, bildet die Basis für die Macula densa-

Theorie (31,64,65,66,67,68). Mikropunktionsversuche zeigten, daß die Erhöhung der NaCl-Konzentration im frühen distalen Tubulus eine Erhöhung der juxtaglomerulären Reninaktivität bewirkt (69).

Von einigen Autoren wurde im Gegensatz dazu angenommen, daß eine Verminderung der tubulären NaCl-Konzentration die Reninfreisetzung stimuliert (62,77,80). Diese Ansicht konnte sich jedoch nicht durchsetzen.

ad c) Volumenrezeptoren-Theorie:

Schon vor längerer Zeit wurden auf die Reninfreisetzung einwirkende Volumenrezeptoren postuliert, die, unabhängig von Barorezeptoren und Blutdruck, den Wasser- und Elektrolythaushalt regulieren sollen (18,61). Davis (14) und Mulrow et al. (46) stellten an hypophysektomierten Hunden fest, daß eine Verminderung des Blutvolumens die Freisetzung einer aldosteronstimulierenden Substanz bewirkte, welche später als Renin erkannt werden konnte. Dieses wurde zur Stütze der Hypothese verwendet, daß im Bereich der juxtaglomerulären Zellen Volumenrezeptoren vorhanden sind (24,73).

Brubacher und Vander (4) vermuteten, daß Volumenrezeptoren und Barorezeptoren nicht identisch sind, da sie feststellten, daß bei Na-Mangel und darauf erfolgreicher Abnahme des EZV die Reninsekretion ansteigt, noch bevor Blutdruck, Nierendurchblutung und Glomerulumfiltrat sich verändert haben.

Kiil (36) und Persson et al. (52) nahmen an, daß die Regulation des EZV über den interstitiellen Druck der Niere gesteuert wird.

Nach Tobian (75) bzw. Davis (15) sollen von extrarenalen Baro- und Volumenrezeptoren ausgehende Impulse vom sympathischen Nervensystem weitergeleitet werden und die intrarenal empfangenen Reize für die Reninausschüttung modulieren.

Lokalisation und Eigenschaften der Volumenrezeptoren sind auch heute nicht aufgeklärt. Sie werden periglomerulär im Bereich der JG-Zellen postuliert. Die Abnahme des EZV stimuliert die Reninfreisetzung, während die Zunahme des EZV einen hemmenden Einfluß ausübt (37). Es ist bekannt, daß der vom RAS abhängige, tubuloglomeruläre Feedback-Mechanismus sich durch Veränderungen des EZV beeinflussen läßt (70).

ad d) Einfluß des sympathischen Nervensystems:

Die Einwirkung der renalen sympathischen Innervation und der adrenalen Katecholamine auf die Reninfreisetzung (78) könnte direkt auf den juxtaglomerulären Apparat erfolgen. Sie könnte aber auch indirekt über die JG-Barorezeptoren durch Beeinflussung der afferenten Arteriolen oder über die Macula densa-Rezeptoren zur Wirkung kommen (15,35, 75,76).

Das Renin-Angiotensin-System trägt unter bestimmten Bedingungen wahrscheinlich auch bei Gesunden zur Aufrechterhaltung des arteriellen Blutdrucks bei. Nach Gabe von A II-Antagonisten (z.B. Saralasin) oder CE-Inhibitoren läßt sich eine Senkung des arteriellen Blutdrucks beobachten (13), so daß man vermuten kann, daß das RAS im Rahmen der Blutdruckregulation eine physiologische Funktion ausübt. In diesem Fall wird das Plasma-RAS wirksam,

während für die oben erwähnte renale Wirkung hauptsächlich die glomerulären Komponenten des RAS von Bedeutung sein sollten.

Das Verhalten des glomerulären RAS im Vergleich zu dem des Plasma-Systems ist bislang weder unter normalen noch unter stimulierenden Bedingungen untersucht worden. Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, das Verhalten der Aktivitäten bzw. Konzentrationen der einzelnen Komponenten des renalen und Plasma-RAS unter normalen Bedingungen und solchen, die zu einer Stimulierung des RAS führen, aufzuklären. Da die Aktivität des A II, der wichtigsten biologisch wirksamen Substanz des Systems, nicht nur vom Renin, sondern auch von den anderen Komponenten des RAS abhängig ist, war es erforderlich, auch diese zu erfassen.

Es wurde das Verhalten der Komponenten des glomerulären und des Plasma-RAS untersucht

1. bei unbehandelten Kontrollratten,
2. bei Ratten vor und nach Applikation des Angiotensin II-Antagonisten Saralasin (A II inhibiert die renale Reninfreisetzung),
3. bei Ratten mit genetisch bedingtem spontanem Hochdruck (spontaneously hypertensive rats = SHR; Ratten der Okamoto-Zucht).

Da die renale Wirkung des RAS sehr wahrscheinlich nur über das Angiotensin II erfolgen kann, wäre es sehr aufschlußreich, das Verhalten dieses Oktapeptids in den

glomerulären Arteriolenwandungen unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen. Dieses ist jedoch zur Zeit technisch noch nicht möglich, so daß wir darauf angewiesen waren, die anderen glomerulären Enzyme des RAS zu messen, um daraus auf die lokale A II-Aktivität schließen zu können.

B. Methoden

a. Präparative Anreicherung eines Ratten-Reninsubstrates:

Das verwendete angereicherte Ratten-Reninsubstrat wurde im Prinzip nach einer bereits beschriebenen Methode hergestellt (5,7,8). Männliche Ratten erhielten etwa zwei Wochen lang eine NaCl-reiche Nahrung, um die PRA herabzusetzen und gleichzeitig die PRSC zu erhöhen. Die Tiere wurden 24 h vor der Entblutung nephrektomiert und das Plasma darauf in folgenden Schritten verarbeitet:

- aa. Fraktionierte Ausfällung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bei pH=7,4 durch wiederholte Zusätze von jeweils 20 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zu 1 l Plasma bis zur Sättigung. Anschließend erfolgte eine Dialyse aller Fällungen 2 Tage lang gegen dest. H_2O (Zusatz von Bykomycin 2,5 g / 50 l) unterhalb $+4^\circ\text{C}$.
- Der Reninsubstratgehalt der einzelnen Fraktionen wurde mit Hilfe des Rattentests bestimmt. Die Fällungen mit den höchsten Reninsubstratgehalten konnten durch eine nachfolgende Sephadex-Gel-Filtration weiter angereichert werden (s. bb).
- bb. Hierzu verwendeten wir das Sephadex-Gel G 75 (fein) und kühlbare Säulen (K 50/100 oder K 25/100) der Firma Pharmacia (Uppsala, Schweden). Die Gel-Filtrationen wurden unterhalb $+5^\circ\text{C}$ durchgeführt und die Fraktionen mit Hilfe eines Fraktionssammlers (Firma LKB) auffangen. Zur Bestimmung des Reninsubstratgehalts diente

auch in diesem Fall der Rattentest mit Hypertensin-Ciba als Eichstandard. Die höchsten spezifischen Reninsubstratgehalte betrugen etwa 1000 bis 1500 ng/mg Protein.

b. Herkunft und Herstellung der verwendeten Reninpräparationen:

Schweine-Renin wurde von der Firma NBC (Cleveland, Ohio) bezogen. - Die Herstellung eines Ratten-Reninpräparates erfolgte, wie nachfolgend beschrieben, nach dem von Haas et al.(33,34)entwickelten Verfahren (Methode C).

aa. Zerkleinerung von 0,2 g Nierenrindengewebe (5 min) bei Zimmertemperatur mit etwa 0,2 g Sand im Porzellanmörser. - Extraktion des Renins mit 10 ml dest. H_2O (15 min, bei $25^{\circ} C$, $pH=6,4$). - Abkühlung des Überstands auf $0^{\circ} C$ nach der Zentrifugation. - Alle weiteren Schritte erfolgten bei etwa $0^{\circ} C$.

bb. Einstellung des Überstands auf $pH=2,2$ durch tropfenweise Zugabe von 0,33 ml 0,5 N H_2SO_4 . - Zugabe von 1,24 ml kaltem 95%igem Äthanol zur Herstellung einer 10%igen Äthanollösung, Aufbewahrung bei $0^{\circ} C$ (1 h ohne Rühren), anschließender Zentrifugation. - Weiteres Protein wurde durch Zugabe von 0,3 ml 0,5 N KOH und erneutes Zentrifugieren entfernt ($pH=4,5$; $0^{\circ} C$).

cc. Ausfällung des Renins aus dem Überstand durch Ansäuern auf $pH=2,3$ (Zugabe von 0,15 ml 0,5 N H_2SO_4) und anschließende Zugabe von 4,25 g festem $(NH_4)_2SO_4$ (End-

konz. 2,3 M). - Nach 10 min Rühren wurde 10 min lang bei 20 000 g zentrifugiert, das Präzipitat in 2 ml dest. H₂O aufgelöst und die Reninlösung (2,2 ml) nach erneuter Zentrifugation bei -20° C aufbewahrt.

c. Zusammensetzung der für die Reninbestimmung im RIA erforderlichen Lösungen:

Verwendet wurde der Kit für den RIA zur (indirekten) Bestimmung der PRA von der Fa. Isotopen Dienst West (IDW).

0,15 M Phosphatpuffer pH=7,4:

5,3 g Na₂HPO₄ • 2 H₂O (Fa. Merck)

1,863 g EDTA • 2 H₂O (Titriplex III) (Fa. Merck)

0,5 g Rinderserumalbumin (Fa. Serva)

wurden mit aqua bidest. auf 500 ml aufgefüllt und der pH-Wert mit einem pH-Meter unter Verwendung von HCl und NaOH auf 7,4 eingestellt.

Angiotensin I-Standardlösung:

Der Inhalt (1 mg) einer Ampulle Angiotensin I (IDW) wurde quantitativ mit aqua bidest. in einen silikonisierten 1 l-Meßkolben übergeführt und der Kolben bei 20° C aufgefüllt. - Von dieser Lösung wurden 10 ml in einen silikonisierten 100 ml-Meßkolben pipettiert und mit aqua bidest. auf 100 ml verdünnt (=100 ng A I/ml). Je 8 ml (800 ng/8 ml) dieser Verdünnung wurden in silikonisierte 10 ml-Fläschchen zu je 2 ml 50%iger Rinderserumalbumin-Lösung (5 g in 5 ml aqua bidest.) abgefüllt. Der Inhalt der Fläschchen wurde eingefroren, lyophilisiert und bis zur Verwendung als A I-

Standard aufbewahrt. Bei Bedarf wurde er mit aqua bidest. in einen silikonisierten 100 ml-Kolben übergeführt und dieser bis zur Eichmarkierung aufgefüllt. Dann wurde die Lösung in 1 ml-Portionen (Eppendorf-Gefäße) aufgeteilt und bis zur Verwendung bei -18°C aufbewahrt (1 ml enthält 8 ng bzw. 100 μl 800 pg A I).

Antiserum:

Die von IDW gelieferten Fläschchen mit lyophilisiertem Antiserum wurden nach Vorschrift mit 10 ml aqua bidest. aufgefüllt und bis zur Verwendung bei $+2^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

J-125-Angiotensin I:

Die ebenfalls mitgelieferten Fläschchen mit lyophilisiertem, radioaktiv markiertem Angiotensin I wurden mit 10 ml aqua bidest. aufgefüllt und bei $+2^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Dextran-Aktivkohle-Suspension:

1 g Aktivkohle-Dextran-Gemisch (10 Teile Kohle [Serva Feinbiochemica, Heidelberg] + 1 Teil Dextran T 70 [Pharmacia, Uppsala, Schweden]) wurde in 180 ml 0,15 M Phosphatpuffer pH=7,4 suspendiert und bei 0°C aufbewahrt. Während des Pipettierens mußte die Lösung mit einem Magnetrührer in Suspension gehalten werden, um das Absetzen der Kohle zu verhindern.

Enzyminhibitorenlösung:

2,0 g EDTA • 2 H₂O (Titriplex III) (Fa. Merck)

6,6 g 8-Oxychinolinsulfat (Fa. Merck)

wurden in einem 100 ml-Kolben mit ca. 80 ml 20%igem Isopropylalkohol unter leichtem Erwärmen (Wasserbad) vollständig gelöst.

0,8 ml BAL (2,3-Dimercaptopropanol-1 / Fa. Merck) wurden hinzugefügt und die Mischung solange geschüttelt, bis eine klare gelbe Lösung entstand. Mit 20%igem Isopropylalkohol wurde dann bis zur Eichmarkierung aufgefüllt und portionsweise eingefroren.

Da die Lösung nicht unbegrenzt haltbar ist, verwendeten wir eine neue, sobald sich eine Trübung einstellte.

I. Aktivitäts- bzw. Konzentrationsbestimmung der
Komponenten des RAS im Plasma:

1. Plasma-Reninaktivität (PRA):

Wir bestimmten die PRA indirekt aus der anfänglichen Bildungsgeschwindigkeit des Angiotensin I. Dieses wird enzymatisch aus dem Reninsubstrat mit Hilfe des Renins freigesetzt.

Die initiale Reaktionsgeschwindigkeit der Angiotensin I-Bildung wurde, wie in der Abb. 1 dargestellt, aus der Steigung der Kurve ermittelt. Die Konzentration des gebil-

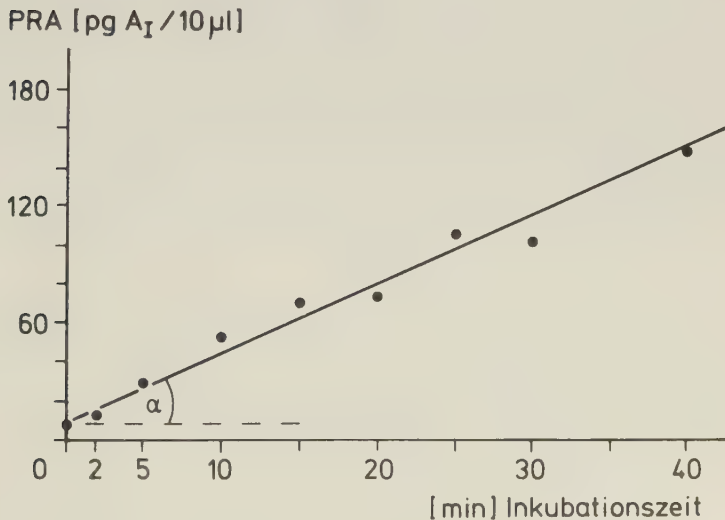


Abb. 1: A I-Bildung in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.
Inkubationsgemisch: 100 µl 0,15 M Phosphatpuffer
(pH = 6,5), 100 µl Plasma, 10 µl Enzyminhibitoren-
lösung (s. Abschnitt B,c). Temp.: 37° C.

deten Angiotensin I ist auf der Ordinate und die Inkubationszeit (Dauer der Reaktion Renin / Reninsubstrat) auf der Abszisse angegeben. Ist die Reninaktivität im Verhältnis zur vorhandenen Reninsubstratkonzentration klein, so ist eine lineare Abhängigkeit zu erwarten. Die anfängliche Steigung dieser Geraden - in der Abb. 1 durch Winkel α gekennzeichnet - ist ein Maß für die Reninaktivität.

Die Konzentration des gebildeten Angiotensin I wurde radioimmunologisch bestimmt. Einzelheiten über den RIA sind nachfolgend angegeben. Dem Inkubationsmedium wurden die Enzymblocker EDTA, 8-Oxychinolinsulfat und BAL (s. Abschn. B,c) zugesetzt, um einen Abbau des Angiotensin I durch unspezifische Peptidasen (Angiotensinasen) oder durch das Converting enzyme (Angiotensin II-Bildung) zu vermeiden.

Da die Angiotensinbildung von verschiedenen Faktoren, wie pH, Temperatur, Reninsubstratkonzentration und Reninaktivität abhängt, mußten zunächst die optimalen Reaktionsbedingungen festgelegt werden.

Das pH-Optimum für die Angiotensin I-Bildung aus Ratten-Renin und homologem Reninsubstrat liegt bei pH = 6,5, wie aus Abb. 2 - übereinstimmend mit früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe (9) - hervorgeht.

Die Angiotensin I-Bildung wird allgemein bei 37°C durchgeführt, obwohl sie in diesem Bereich stark temperaturabhängig ist (10). Die Inkubationen für die vorliegenden Untersuchungen wurden jedoch ebenfalls bei 37°C ausgeführt, um mit Literaturwerten vergleichen zu können. Günstiger wäre es, bei einer

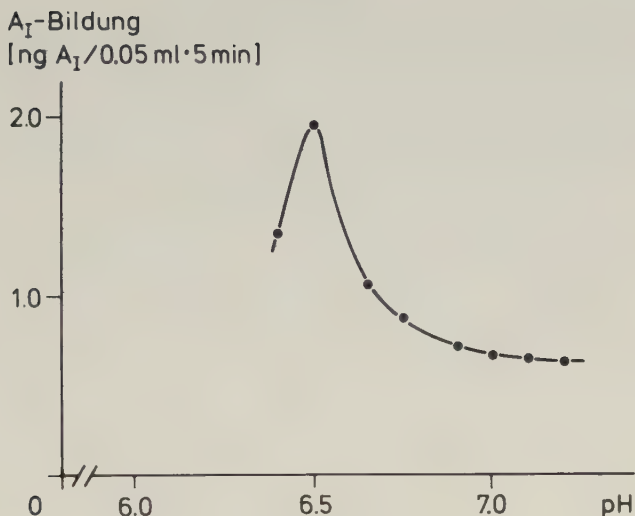


Abb. 2: Abhängigkeit der A_I-Bildung vom pH-Wert.
Inkubationsmischung: 0,1 ml angereichertes Ratten-Reninsubstrat (1350 ng/ml), 0,1 ml 0,15 M Phosphatpuffer (verschiedene pH-Werte), 0,02 ml EDTA (20 mg/ml), 0,02 ml DFP (1 g/5 ml Isopropylalkohol, 1:70 verd.), 0,02 ml Trasylol (10 000 KIE/ml), 0,05 ml angereichertes Ratten-Renin (1:20 verd.).

niedrigeren Temperatur, z.B. bei 25° C, zu inkubieren, jedoch wird die Empfindlichkeit der Methode dadurch wesentlich vermindert. Von einigen Autoren (60) wird die Renin-Messung oberhalb 40° C (Temperaturmaximum) durchgeführt, wodurch die Empfindlichkeit deutlich gesteigert wird. Da bei dieser für Enzymreaktionen sehr hohen Temperatur jedoch eine partielle Denaturierung auftreten kann, sollten die bei hohen Temperaturen ermittelten Resultate kritisch be-

trachtet werden.

Die Abhängigkeit der Angiotensin I-Bildung von der Puffer- und von der Reninsubstratkonzentration ist bereits systematisch untersucht, so daß die optimalen Bedingungen der Literatur entnommen werden konnten (6, 7).

Die für die radioimmunologische PRA-Bestimmung verwendeten Plasmaproben wurden folgendermaßen gewonnen:

Etwa 1 ml Blut wurde aus der katheterisierten A. carotis der mit Inactin (100-120 mg/kg KG i.p.) narkotisierten Versuchsratten in Eppendorf-Reaktionsgefäße aufgenommen und sofort kalt zentrifugiert (13000g, 2 min, $<+4^{\circ}$ C). Das überstehende Plasma wurde abpipettiert und bis zur Verwendung in Eppendorf-Gefäßen bei -80° C aufbewahrt.

Die biologische Meßmethode (Angiotensin-Rattentest, Bioassay):

Die 125-175 g schweren weiblichen Ratten wurden mit Inactin (100-120 mg/kg KG i.p.) narkotisiert und die Trachea, A. carotis und V. jugularis katheterisiert. Von der Angiotensin-haltigen Probe wurden 0,01-0,05 ml in die V. jugularis injiziert, was zu einer kurzzeitigen arteriellen Blutdruckerhöhung führte, welche in der A. carotis mit Hilfe eines angeschlossenen Druckverstärkers und eines Direktschreibers fortlaufend registriert wurde. Die Angiotensinwerte wurden als ng Hypertensin-Ciba ausgedrückt (Eichstandard). In der Abb. 3 ist eine Eichkurve dargestellt.

Radioimmunologische Bestimmung der PRA (RIA):

Die Plasma-Reninaktivität läßt sich mit Hilfe des RIA

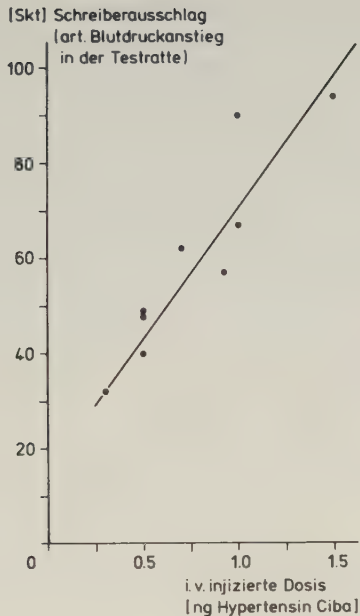


Abb. 3: Hypertensin-Eichkurve. Das Hypertensin wurde einer Ratte (ca. 150 g KG) in die katheterisierte V. jugularis injiziert und das Blutdruckverhalten mit einem Druckverstärker in der A. carotis gemessen. Ordinate: arterieller Blutdruck in Skalenteilen (Schreiber Ausschlag).

für Angiotensin I indirekt bestimmen. Dabei wird die zeitliche Abhängigkeit der Angiotensin I-Bildung in einer bei 37° C in Phosphatpuffer (pH = 6,5) inkubierten Plasmaprobe ermittelt, deren Angiotensinasen geblockt wurden.

Zunächst wird jedem Probenröhrchen eine konstante Menge (50 µl) an radioaktiv markiertem A I (J-125) und 50 µl A I-Antikörper zugesetzt. Darauf werden 10-50 µl der Plasmaprobe oder 100 µl des Angiotensin-Eichstandards einpipettiert.

Das in der Probe enthaltene A I verdrängt, je nach seiner Konzentration, mehr oder weniger J-125-A I aus der Antikörperbindung, so daß das freigesetzte J-125-A I als Maß für den Angiotensin I-Gehalt der Probe verwendet werden kann. Diese Verdrängungsreaktion erfolgt bei $+4^{\circ}\text{C}$ und dauert 20-24 h. Anschließend wird dem Gemisch Aktivkohle zugesetzt, um das freie A I zu binden. Die überstehende Lösung wird nach einer Zentrifugation dekantiert und die Verteilung der Radioaktivität gemessen.

Das prozentuale Verhältnis von an Antikörpern gebundenem zum insgesamt zugesetzten J-125-A I gibt das Ausmaß der Verdrängung des J-125-A I durch das in der Probe gebildete Angiotensin I an und ermöglicht die Ermittlung der PRA.

Zur Eichung diene eine Verdünnungsreihe (0-50-100-200-400-800 pg A I / 100 ml), die aus einer Stammlösung mit bekanntem Angiotensin I-Gehalt hergestellt wurde (s. Angiotensin I-Standardlösung, Abschn. B,c).

Die Zusammensetzung der Inkubationslösungen für den RIA war wie folgt:

	Stand.A I- Proben	Plasma- Proben
0,15 M Phosphatpuffer (pH=7,4)	300 μl	350-390 μl
Stand.A I-Verdünnungen(0-800 pg A I)	je 100 μl	----
J-125-A I	50 μl	50 μl
Antiserum	50 μl	50 μl
inkubierte Plasmaprobe	----	10-50 μl

Die angesetzten Proben wurden kurz geschüttelt und daraufhin 20-24 h bei $+4^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Nach dieser Zeit ist das Bindungsgleichgewicht erreicht (41).

Um das vom Antikörper gebundene A I vom freien zu trennen, wurden anschließend in jedes Proberöhrchen 750 µl der Dextran-Aktivkohle-Suspension pipettiert, die Röhrchen geschüttelt und 10 min lang bei 0° C stehengelassen. Dann wurden die Proben zentrifugiert (10 min, < +4° C, 13000g) und der Überstand dekantiert. Von jeder Probe entstanden zwei Fraktionen: Kohlesediment und Überstand. In beiden wurde die Radioaktivität mit Hilfe eines γ-Zählers (Tracerlab gamma gard 150, spectromatic bzw. LKB Wallac, 127Q Rackgamma) gemessen und anschließend das Verhältnis von an Antikörpern gebundenem zum gesamten J-125-A I aus den Zählraten ermittelt.

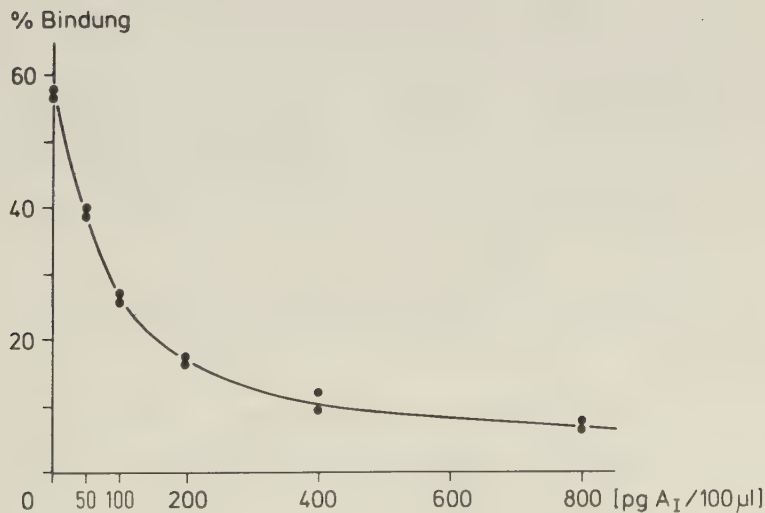


Abb. 4: Eichkurve des RIA für die Angiotensin I-Bestimmung.
 Abszisse: Verdünnungen der A I-Standardlösung. Ordinate:
 prozentuale Bindung $\left(\frac{\text{Zählrate des gebund. A I} \times 100}{\text{Zählrate d. gebund. A I} + \text{Zählrate d. freien A I}} \right)$

Mit den Werten der Standard-Angiotensin I-Proben wurde eine Eichkurve aufgezeichnet (Abb. 4), bei der die prozentuale Bindung $\left(\frac{\text{Zählrate des gebundenen A I} \times 100}{\text{Zählrate d. gebund. A I} + \text{Zählrate d. freien A I}} \right)$ auf die Ordinate und der A I-Gehalt der einzelnen Verdünnungen der Standard-Lösung auf die Abszisse aufgetragen wurden. Daraus konnten die unbekannten A I-Gehalte der Plasmaproben bestimmt werden.

Für die Bestimmung der PRA inkubiert man das Plasma unter Zusatz von Angiotensinasen- und Converting enzyme-Inhibitoren bei 37° C insgesamt etwa 30 min lang. Der Inkubationsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

<u>PRA</u>	50 µl	0,15 M Phosphatpuffer (pH = 6,5)
	50 µl	Plasma
	5 µl	Enzyminhibitorenlösung (s. Abschn. B,c)

Die Inkubationsmischungen wurden kalt ($< +4^{\circ}$ C) angesetzt und kalt zentrifugiert (13000g, 2 min), dann bei 37° C inkubiert. Nach 0, 10, 20, 30 min Inkubation wurden den Mischungen jeweils 10 µl entnommen und in den RIA, wie oben beschrieben, eingesetzt.

Nach Ermittlung des Angiotensin I-Gehalts läßt sich die PRA aus der A I-Bildungsgeschwindigkeit in ng/ml · h berechnen.

Die so gewonnenen PRA-Werte sind höher als sie im allgemeinen in der Literatur angegeben werden (43). Dies ist in erster Linie darauf zurückzuführen, daß sie reaktionskinetisch innerhalb der ersten 15 min nach Reaktionsbeginn ermittelt wurden. Eine solche Bestimmung ist in Abb. 5 (Kurve a) dargestellt. Aus der Abbildung ist ersichtlich, daß sich die

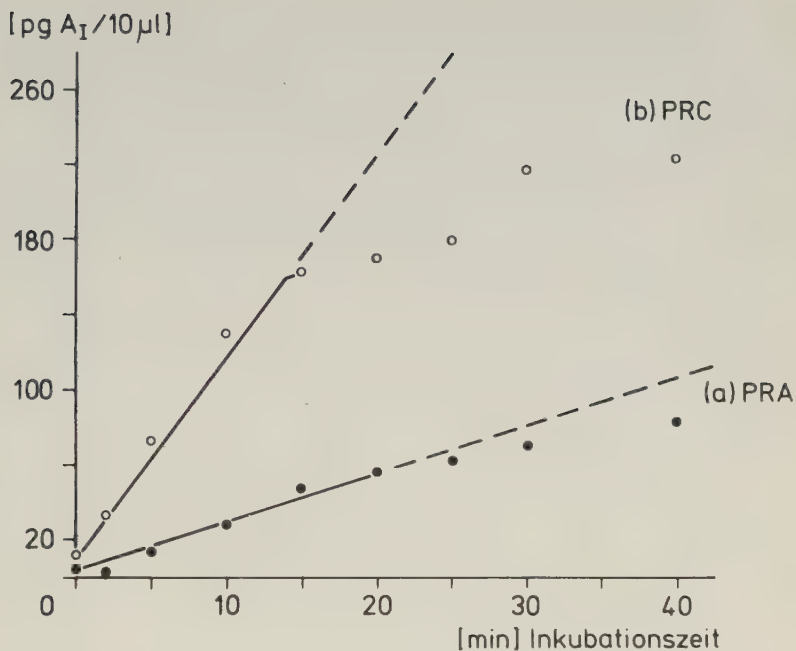


Abb. 5: Reaktionskinetische Messung der PRA(a) und PRC(b).
Abszisse: Inkubationszeit in min, Ordinate: pg gebildetes A I in 10 µl Inkubationsgemisch. pH=6,5 , Temp. 37° C. Inkubationsgemisch:
(a) 50 µl 0,15 M Phosphatpuffer (pH=6,5)
50 µl Plasma, 5 µl Enzyminhibitorenlösung
(s. Abschn. B,c)
(b) 50 µl angereichertes Ratten-Reninsubstrat(2000 ng/ml)
50 µl Plasma, 5 µl Enzyminhibitorenlösung.

A I-Bildung nur in den ersten 10-15 min der Inkubation annähernd linear verhält. Wahrscheinlich liegt die Reninsubstratkonzentration anfänglich noch im Sättigungsbereich für die PRA. Die anfängliche A I-Bildungsgeschwindigkeit darf nur solange als Maß für die PRA verwendet werden, wie die Kurve der A I-Bildung linear verläuft.

Würde keine reaktionskinetische Bestimmung durchgeführt, sondern nur ein Wert nach einer festgesetzten Inkubationsdauer gemessen - z.B. im Bereich zwischen 30-40 min in der Abb. 5 (Kurve a) - so wäre die Steigung der Geraden, die durch 0 und diesen Punkt gelegt wird, wesentlich kleiner, so daß die A I-Bildungsgeschwindigkeit zu niedrig bestimmt werden würde.

Die reaktionskinetische Bestimmung erlaubt es einerseits, den Zeitpunkt festzulegen, bis zu welchem die Meßpunkte zur Auswertung herangezogen werden können. Andererseits erkennt man aus dem Kurvenverlauf, ob optimale Reaktionsbedingungen (Substratsättigung, vollständige Angiotensinase-Inhibition) vorgelegen haben.

Ist durch Voruntersuchungen geklärt, daß die A I-Bildung während der Inkubationsdauer linear erfolgt, darf man Endwertbestimmungen (nach 15-20 min) durchführen. Auf diese Weise wurden unsere durch Endwertbestimmungen gewonnenen PRA-Werte durch reaktionskinetische Vorversuche abgesichert.

Die Genauigkeit der PRA-Messungen im RIA wurde als Variationskoeffizient ausgedrückt (55):

$$\left(\text{prozentuale Standardabweichung} = \frac{\text{Standardabweichung} \times 100}{\text{Arithm. Mittel der Meßwerte}} \right)$$

Bei den reaktionskinetisch durchgeführten Bestimmungen wurde für jeden Meßwert im linearen Bereich der A I-Bildung die Reninaktivität berechnet. So erhält man mehrere PRA-Werte, die gemittelt und statistisch ausgewertet werden können (Mittelwert und Standardabweichung, SD).

Tabelle I

Beispiel für die Auswertung einiger reaktionskinetischer PRA-Bestimmungen (Angaben in pg A I / 10 μ l · min ; die einzelnen Meßwerte sind durch die Inkubationsdauer dividiert ; Messung im RIA ; Variationskoeffizient = Vk)

RIA a
(Ratte 1)

0,60
0,40
0,43
0,43
0,40
0,38
m= 0,44
<u>+0,08</u>
Vk= 18 %

RIA b
(Ratte 2)

3,0
4,0
4,0
4,4
m= 3,8
<u>+0,72</u>
Vk= 19 %

RIA b
(Ratte 3)

2,5
6,2
6,4
6,1
m= 5,3
<u>+1,87</u>
Vk= 32 %

RIA b
(Ratte 4)

2,0
2,2
2,5
2,9
m= 2,4
<u>+0,39</u>
Vk= 16 %

Vk-MW: 22 %
(Ratte 2-4)

RIA c
(Ratte 5)

6,6
3,3
4,3
4,3
m= 4,6
<u>+1,4</u>
Vk= 30 %

RIA c
(Ratte 6)

3,6
6,2
m= 4,9
<u>+1,84</u>
Vk= 38 %

RIA c
(Ratte 7)

1,6
5,3
m= 3,45
<u>+2,62</u>
Vk= 76 %

Vk-MW: 48 %
(Ratte 5-7)

Mittelwert der PRA :

m = 3,56 $\pm$ 1,69 pg A I / 10 μ l · min

Mittelwert der Variationskoeffizienten

im Intraassay : 33 $\pm$ 21 % , n = 7

(RIA a,b,c - Ratte 1-7)

Mittelwert der

Mittelwerte :

m= 35 $\pm$ 18 %

(RIA b,c -

Ratte 2-7)

Die Auswertung einiger reaktionskinetischer PRA-Bestimmungen für normale Ratten ist als Beispiel in Tabelle I zusammengefaßt. Die mittlere PRA betrug $3,56 \pm 1,69$ pg A I/ $10 \mu\text{l} \cdot \text{min}$. Der Variationskoeffizient für die Fehlerbreite der Bestimmung einer Plasmaprobe innerhalb eines RIA (Intra-assay) war im Mittel 33 ± 21 %. Die mittlere Fehlerbreite von PRA-Werten in Plasmen von mehreren Normalratten, in einem RIA gemessen, betrug 35 ± 18 %.

Die Streuung der PRA-Messung von verschiedenen normalen Tieren war also nicht größer als die einer Vielfachmessung einer Plasmaprobe in einem Assay. Die durch die Meßmethode bedingte Fehlerbreite sollte daher in der Größenordnung der biologischen Streuung liegen.

2. Plasma-Renin„konzentration“ (PRC):

Als Maß der PRC wurde die anfängliche A I-Bildungsgeschwindigkeit bei Substratsättigung verwendet. Hierzu mußte dem Plasma angereichertes Reninsubstrat (s. Abschn. B,a) zugesetzt werden. Da beim Vorliegen eines Substratüberschusses die A I-Bildung unabhängig von der Reninsubstratkonzentration erfolgt, kann in diesem Fall die A I-Bildungsgeschwindigkeit als ein direktes Maß des Reningehalts (Renin„konzentration“) angesehen werden.

Die Abb. 5 (Kurve b) zeigt den zeitlichen Verlauf der A I-Bildung unter diesen Bedingungen (37°C , $\text{pH} = 6,5$, Substrat 2000 ng/ml). Auf der Abszisse ist die Inkubationsdauer in

Tabelle II

Beispiel für die Auswertung einiger reaktionskinetisch
gewonnener PRC-Werte (Angaben in pg A I / 10 μ l • min ;
die einzelnen Meßwerte sind durch die Inkubationsdauer
dividiert ; Messung im RIA ; Variationskoeffizient = Vk)

1,30
1,25
1,40
1,45
1,48
1,30

m= 1,4
+0,09
n= 6
Vk= 6 %

6,5	26,0	10,1
8,6	28,8	10,5
6,5	23,4	12,2
m= 7,2	m= 26,1	m= 11,2
+1,2	+ 2,7	+ 1,0
n= 3	n= 3	n= 4
Vk= 17 %	Vk= 10 %	Vk= 9 %
		Vk-MW: 12 %

9,0	6,5	11,0
9,2	5,6	6,4
11,8	6,4	7,6
m=10,0	m= 6,2	m= 8,3
+ 1,6	+0,5	+2,4
n= 3	n= 3	n= 3
Vk= 16 %	Vk= 8 %	Vk= 29 %
		Vk-MW: 17 %

Mittlere PRC : m= 15 + 4 %
n= 2
m = 10,06 + 7,74 pg A I / 10 μ l • min ,
n = 7

Mittelwert der Variationskoeffizienten
im Intraassay : 14 + 8 % , n = 7

3. Plasma-Reninsubstratkonzentration (PRSC):

Zur Bestimmung der PRSC muß Renin im Überschuß zugesetzt werden, um das Angiotensinogen vollständig in Angiotensin I umzuwandeln. Dieses ist dann der Messung zugänglich, wobei sowohl der Angiotensin-Rattentest (Bioassay) als auch der A I-RIA verwendet werden können. In jedem Fall muß darauf geachtet werden, daß das gebildete Angiotensin I durch im Inkubationsgemisch enthaltene Angiotensinasen oder Converting enzyme nicht weiter umgesetzt wird. Dieses wird durch geeignete Enzymblocker (s. Abschn. B,c) erreicht. Die im RIA erhaltenen Meßwerte waren im allgemeinen um den Faktor 1,5 - 1,7 höher als die im Angiotensin-Rattentest ermittelten, was mit den Ergebnissen anderer Autoren etwa übereinstimmt (43).

Um die Genauigkeit der im RIA gemessenen Reninsubstrat-Werte überprüfen zu können, wurde in einigen Fällen der Reninsubstratgehalt von angereichertem Ratten-Reninsubstrat (s. Abschn. B,a) bekannter Konzentration (im Rattentest ermittelt) bestimmt. Die Zusammensetzungen der verschiedenen Inkubationsansätze sind bei den entsprechenden Ergebnissen dieser Versuche (Tab. III und IV) angeführt. Die Inkubationsgemische wurden bei 37° C, 60-90 min bzw. 20 min lang inkubiert. Nach jeweils 5-10 min wurden 10-20 µl entnommen und in den RIA (s. Abschn. B, I,1) eingesetzt.

Reaktionskinetische Messungen sind in Abb. 6 - 9 graphisch dargestellt. Die Kurve c in Abb. 6 ist ein Beispiel für einen Kurvenverlauf, bei dem - nach anfänglichem

Tabelle III

Reninsubstratbestimmung im RIA

Reninsubstratkonzentration der Stammlösung 2060 ng/ml (im Rattentest ermittelt)

Bezeich- nung in Abb. 6	Stamm- lösung (μ l)	Renin-Puffer- Inhibitorenlösung* (μ l)	eingesetzte Substrat (pgA / 20 μ l)	ermittelte Substratkonzentration (pgAI/20 μ l) (ngAI/ml)	erzielte Konzentration (%)
(a)	100	ad	400	10 300	180
(b)	50	ad	400	5 150	172
(c)	50	ad	400	5 150	-----abfallende Kurve-----
(d)	5	ad	560	368	170 952 46

* Zusammensetzung der Renin-Puffer-Inhibitorenlösung :

steigende Mengen einer Renin-Stammlösung: (a) 15 μ l , (b) 20 μ l , (c) 40 μ l ,
(d) 50 μ l ;

5 μ l Enzyminhibitorenlösung (Zusammensetzung s. Abschn. B, c) ;

0,15 M Phosphatpuffer (pH = 6,5) .

Tabelle IV

Reninsubstratbestimmung im RIA

Reninsubstrat-Stammlösung 1:20 verd. (103 bzw. 133 ng/ml, im Rattentest ermittelt)

Bez.in Abb. 9	verd. Stamm- lösung (μ l)	Renin-Puffer- Inhibitoren- lösung* (μ l)	eingesetzte Substratkonzentration (pgA / 10 μ l)	ermittelte (pgAI/ 10 μ l)	(ngAI/ml)	(%)
(a)	50	ad	105	490	380	80 78
(b)	25	"	"	245	270	113 110
(c)	12,5	"	"	123	160	134 130
	12,5	"	"	123	335	281 272
	6,25	"	"	61	125	210 205
(d)	3,125	"	"	31	75	252 242
	1	"	"	13	--abfallende Kurve--	
	2	"	"	25	--abfallende Kurve--	
(e)	3	"	"	38	245	858 645
	5	"	"	63	800	1680 (13X)
	7,5	"	"	95	875	1225 (9X)
	10	"	"	127	außerhalb Meßbereich	
	12,5	"	"	158	außerhalb Meßbereich	
	15	"	"	190	--abfallende Kurve--	
	20	"	"	253	--abfallende Kurve--	
	25	"	"	317	--abfallende Kurve--	
	30	"	"	380	780	273 205
	40	"	"	507	außerhalb Meßbereich	
	50	"	"	633	außerhalb Meßbereich	
	2	"	210	13	50	525 385
	4	"	"	25	80	420 320
	6	"	"	38	90	315 237
(f)	8	"	"	51	170	446 333
	10	"	"	63	--abfallende Kurve--	
	15	"	"	95	245	343 258
	20	"	"	127	--abfallende Kurve--	
	25	"	"	158	--abfallende Kurve--	
	30	"	"	190	160	112 84
	40	"	"	253	170	89 67
	60	"	"	380	--abfallende Kurve--	
	80	"	"	507	--abfallende Kurve--	
	100	"	"	633	--abfallende Kurve--	

* Zusammensetzung der Renin-Puffer-Inhibitorenlösung :

0,050 bzw. 0,100 ml einer Renin-Stammlösung

0,005 bzw. 0,010 ml Enzyminhibitorenlösung

(Zusammensetzung s. Abschn. B,c)

0,15 M Phosphatpuffer (pH = 6,5)

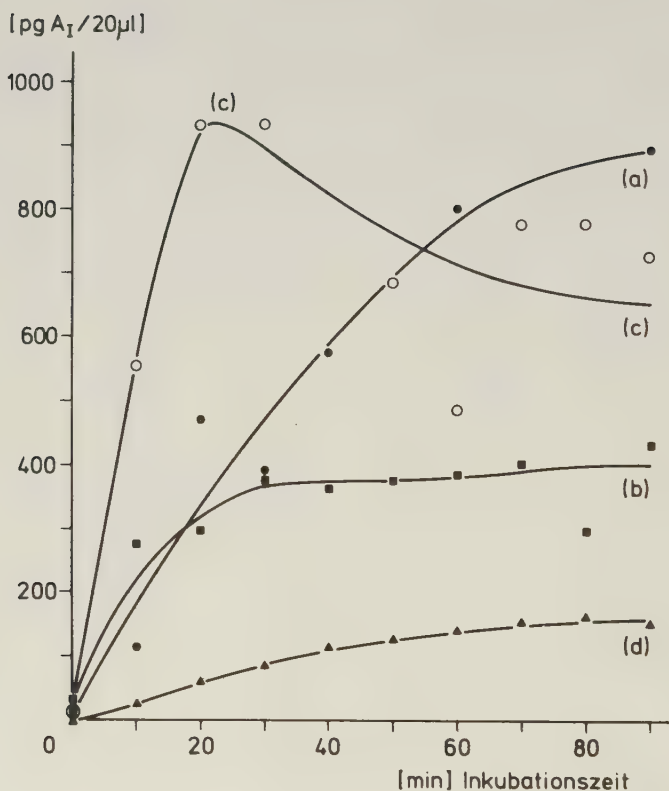


Abb. 6: Reaktionskinetische Messung der Reninsubstratkonzentration im RIA (s. auch Tab. III)
 Der Inkubationsansatz bestand aus:
 verschiedene Mengen einer Reninsubstrat-Stammlösung (2060 ng/ml): (a) 100 µl, (b) 50 µl, (c) 50 µl, (d) 5 µl
 steigende Mengen einer Renin-Stammlösung:
 (a) 15 µl, (b) 20 µl, (c) 40 µl, (d) 50 µl;
 0,005 ml Enzyminhibitorenlösung (s. Abschn. B,c);
 0,15 M Phosphatpuffer pH=6,5 ad 400 bzw. 560 µl.

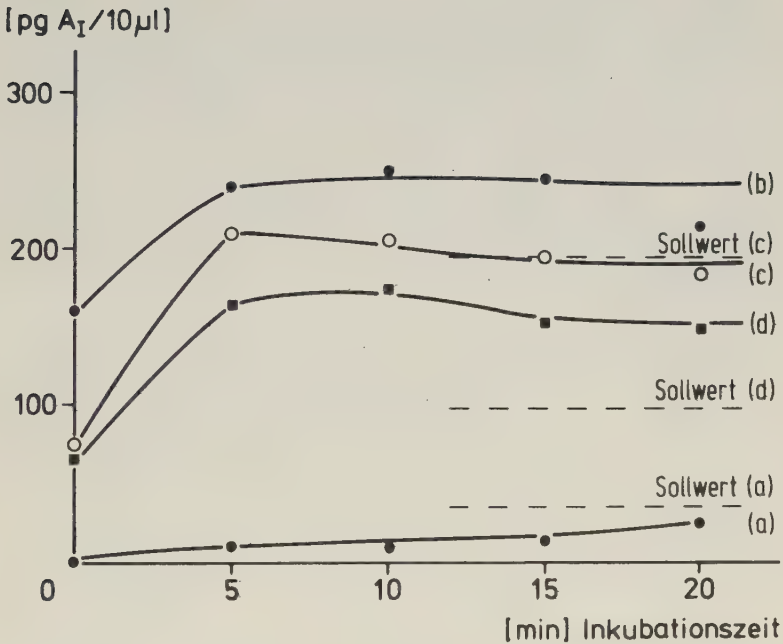


Abb. 7: Reaktionskinetische Messung der Reninsubstrat-konzentration im RIA
Der Inkubationsansatz bestand aus:
verschiedene Mengen einer 1:5-verdünnten Reninsub-
strat-Stammlösung (ca. 412 ng/ml): (a) 5 µl,
(b) 10 µl, (c) 5 µl, (d) 2,5 µl;
50 µl einer Reninstammlösung;
5 µl Enzyminhibitorenlösung (s. Abschn. B,c);
0,15 M Phosphatpuffer pH=6,5 ad 105 bzw. 560 µl.

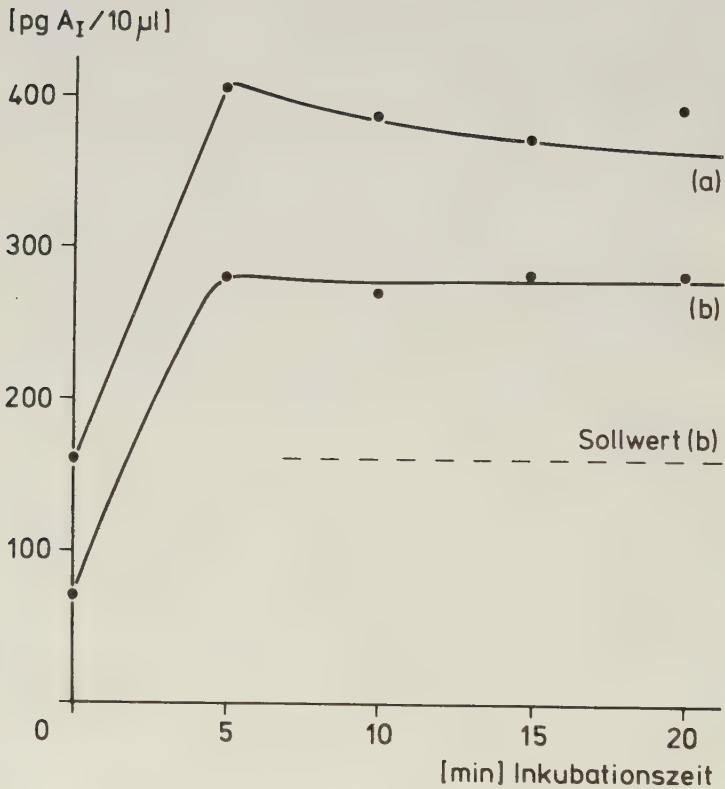


Abb. 8: Reaktionskinetische Messung der Reninsubstrat-konzentration im RIA
Der Inkubationsansatz bestand aus:
verschiedene Mengen einer 1:15-verdünnten Renin-substrat-Stammlösung (ca. 137 ng/ml): (a) 50 μl,
(b) 12,5 μl;
0,050 ml einer Reninstammlösung;
0,005 ml Enzyminhibitorenlösung (s. Abschn. B,c);
0,15 M Phosphatpuffer pH=6,5 ad 105 μl.

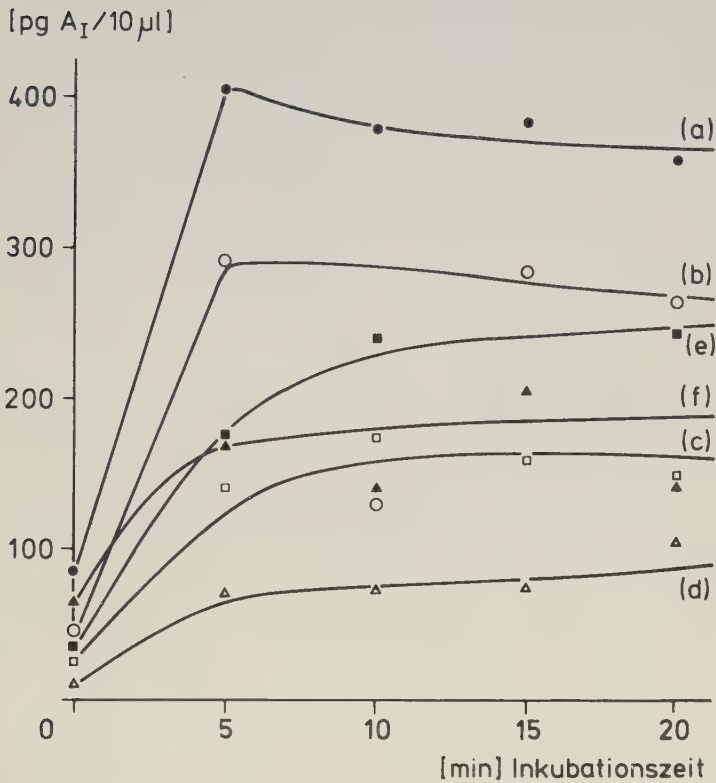


Abb. 9: Reaktionskinetische Messung der Reninsubstrat-konzentration im RIA (s. auch Tab. IV)
Der Inkubationsansatz bestand aus:
verschiedenen Mengen einer 1:20-verdünnten Reninsubstrat-Stammlösung (103 ng/ml): (a) 50 µl, (b) 25 µl, (c) 12,5 µl, (d) 3,125 µl, (e) 3 µl, (f) 8 µl;
50 µl einer Reninstammlösung;
5 µl Enzyminhibitorenlösung (s. Abschn. B,c);
0,15 M Phosphatpuffer pH=6,5 ad 105 bzw. 210 µl.

Anstieg - die A I-Bildung abfällt. Dies könnte ein Zeichen dafür sein, daß die Hemmung der Angiotensinasen bzw. des CE nicht vollständig war oder eine bislang unbekannte Ursache die A I-Bildung hemmte. Diese und andere abfallende Kurven wurden in den Versuchsauswertungen vernachlässigt. Da die ersten Ergebnisse der RSC-Bestimmung (Tab. III) weit niedriger waren (8-46%) als die verwendete Substratkonzentration (Bestimmung im Rattentest), wurde diese bei weiteren Versuchen verdünnter eingesetzt, um ein günstigeres Verhältnis der Reninsubstratkonzentration zur Reninaktivität zu erreichen.

Bei Berücksichtigung, daß im RIA ermittelte Reninsubstratkonzentrationen bis zu 1,7mal (170%) höher sein sollten als im Rattentest, fällt auf, daß bei sehr kleinen Konzentrationen des eingesetzten Substrats (s. Tab. IV: $<190 \text{ pg}/10 \mu\text{l}$ Inkubationsgemisch) sehr hohe Werte (200-1300 %) ermittelt werden. Eine Erklärung für diese hohen Werte könnte sein, daß - in dieser starken Verdünnung - sonst aneinander gebundene Eiweißkörper frei auftreten, von den im RIA verwendeten A I-Antikörpern gebunden werden und eine erhöhte A I-Konzentration vortäuschen. Über eine ähnliche Störung des RIA durch Plasmaproteine haben Malvano et al. (41) und Page et al. (48) berichtet.

Außerdem wurde untersucht, ob die anfängliche A I-Bildungsgeschwindigkeit bei konstanter Reninaktivität und niedriger Reninsubstratkonzentration auch im vorliegenden Fall

als Maß für die Reninsubstratkonzentration angesehen werden kann. Diese Art der Reninsubstratbestimmung hat jedoch den Nachteil, daß ein Reninstandard benötigt wird, dessen Aktivität über größere Zeiträume konstant bleiben muß. In Abb. 10

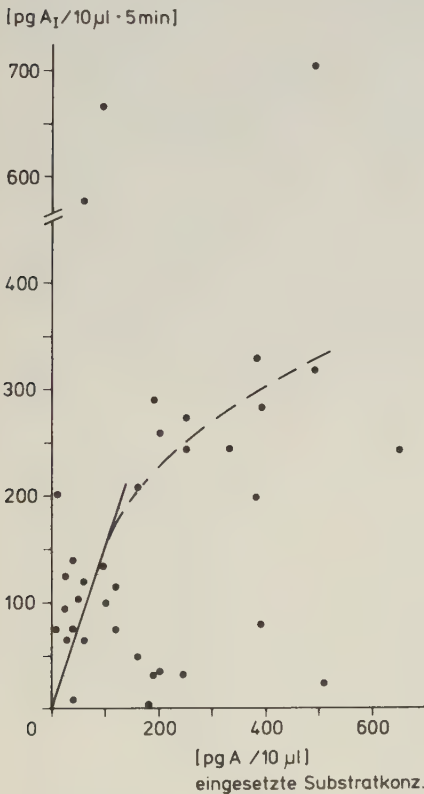


Abb. 10:

A I-Bildungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Substratkonzentration
Abszisse: eingesetzte Substratkonzentration in pg A pro 10 µl Inkubationsgemisch;
Ordinate: A I-Bildungsgeschwindigkeit in pg A I pro 10 µl Inkubationsgemisch (5 min nach Inkubationsbeginn).

wurde die in mehreren Messungen ermittelte A I-Bildungsgeschwindigkeit gegen die eingesetzte Substratkonzentration aufgetragen. Es zeigte sich, daß die anfängliche A I-Bildungsgeschwindigkeit nur für sehr stark verdünntes Substrat

(bis 100 pg/10 μ l Inkubationsgemisch) annähernd linear verläuft und die Steigung der Kurve bei höheren Substratkonzentrationen abnimmt. Es ist möglich, daß die mit höheren Substratkonzentrationen auch vermehrt vorhandenen Proteine die Reaktion zunehmend beeinflussen.

Da eine stärkere Verdünnung des Substrats jedoch nach den Ergebnissen der Tabelle IV nicht sinnvoll erschien, wurde das Reninsubstrat bei der A I-Bildung (37° C) weniger verdünnt (etwa 900 pg/10 μ l Inkubationsgemisch) eingesetzt und erst anschließend zum RIA die erforderliche Verdünnung hergestellt (81). Um einen möglicherweise störenden „Eiweißfaktor“ ausschließen zu können, wurden die Proben nach der 37° C-Inkubation 5 min lang auf 100° C erhitzt und anschließend abzentrifugiert.

Die Zusammensetzung des Inkubationsansatzes, die im RIA eingesetzte Verdünnung der Proben und die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Tab. V beschrieben. Bei diesem Versuch wurden die Proben 10 min lang inkubiert, da zu beobachten war (s. kinetische Reaktionsmessungen Abb. 6-9), daß größtenteils nach 10 min die höchste A I-Bildung bereits erreicht war. Die Resultate zeigen (Tab. V), daß - mit Ausnahme von 6 aus 20 Bestimmungen mit weniger verdünntem Substrat (eingesetzte Substr.konz.: > 100 pg A I/50 μ l) und einem zu hohen Wert - die Substratkonzentration mit 82-200% bestimmt wird, wobei sehr hohe Verdünnungen eingesetzt waren.

Die so gewonnenen Ergebnisse sind in Abb. 11 in Abhängigkeit von der Verdünnung des eingesetzten Substrats graphisch

Tabelle V

Reninsubstratbestimmung im RIA

Reninsubstratkonzentration der RS-Stammlösung 2000 ng/ml (im Rattentest ermittelt, s. Abschn. B, I, 1)

Ansatz	Probe (μ l)	0,15 M Phosphat- puffer (pH=7,4) (μ l)	eingesetzte Substratkonzentration (pgA / 50 μ l)	ermittelte Substratkonzentration (pgAI/50 μ l)	(%)
50 μ l RS-Stammlösung (100 ng) in 1120 μ l Inkubationslösung (s.u.), davon(nach der Inkubation bei 37°C)	50 " " " " " "	ad " " " " " "	446 446 223 223 112 112 112 74 74 56 56	95 426 54 242 77 690 96 860 73 1308 39 609 61 1640 402 10806 105 3763 107 3835	21 12 12 35 43 65 35 82 543 188 191
50 μ l RS-Stammlösung 1:1 verd. mit 0,15 M Phosphatpuffer pH=6,5 (50 ng) in 1120 μ l Inkubationslösung (s.u.), davon(nach der Inkubation bei 37°C)	50 " " " " " "	ad " " " " " "	223 223 112 112 56 56 37 37 28	171 1532 447 4005 104 1864 116 2079 71 2545 56 2007 71 3817 65 3494 48 3440 52 3727	77 200 200 93 104 93 127 100 192 176 171 186

Zusammensetzung der Inkubationslösung:

0,200 ml Neomycinsulfat (0,5%ig in 0,15 M Phosphatpuffer pH=6,5)

0,750 ml 0,15 M Phosphatpuffer (pH = 6,5)

0,100 ml Schweine-Renin (20 GE /ml H₂O)

0,010 ml DFP (1,0 ml DFP ad 20 ml Isopropanol)

0,010 ml Enzyminhibitorenlösung (Zusammensetzung s. Abschn. B,c)

Nach Zugabe der 50 μ l unverdünnter und 1:1 verdünnter RS-Stammlösung Inkubation der Proben 10 min bei 37°C. Zentrifugation der Proben, Verwendung des Überstands zur Herstellung folgender Verdünnungen (mit 0,15 M Phosphatpuffer pH=7,0): 1:10, 1:20, 1:40, 1:60, 1:80. Aus diesen Verdünnungen wurden jeweils 2mal 50 μ l in den RIA eingesetzt, die als Maß für die Substratkonzentration dienende A I-Konzentration ermittelt und in ng A I/ml angegeben.

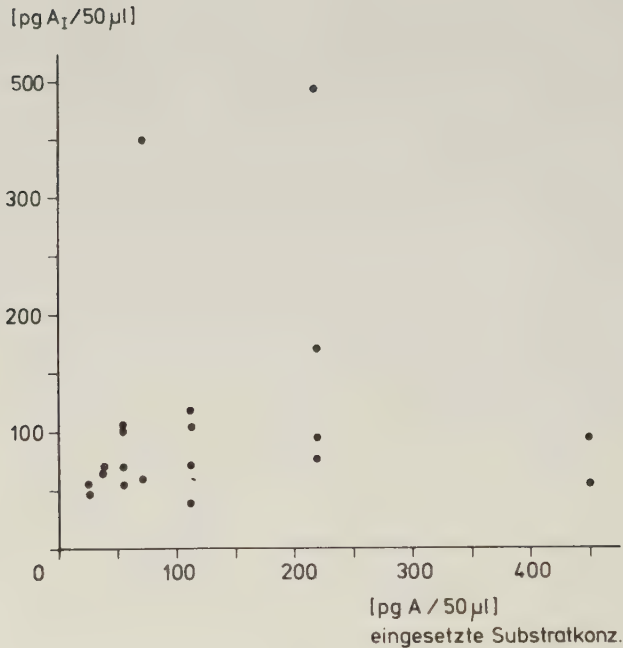


Abb. 11: A I-Bildung in Abhängigkeit von der Verdünnung des eingesetzten Reninsubstrats. Abszisse: eingesetzte Substratkonzentration in pg A pro 50 µl Inkubationsgemisch; Ordinate: A I-Bildung in pg A I pro 50 µl Inkubationsgemisch.

dargestellt.

Zur Bestimmung der Plasma-Reninsubstratkonzentration konnte der bereits beschriebene Ansatz (Tab. V) verwendet werden, wenn anstelle des Substrats bekannter Konzentration die unbekannten Plasmaproben eingesetzt wurden. Die große Anzahl der Meßwerte (verschiedene Verdünnungen) für die Bestimmung einer Reninsubstratkonzentration ermöglichte die

Tabelle VI

Ergebnisse einiger PRSC-Bestimmungen

(Angaben in ng/ml, Messung im RIA, Variationskoeffizient = Vk)

1837	2598	2464	1792	672	829
1792	2688	2330	1971	699	806
1147	2554	2419	1702	771	896
1236	2401	2419	1747	753	914
1075		2222	2150	785	896
<u>m= 1417</u>	<u>m= 2560</u>	<u>m= 2370</u>	<u>m= 1872</u>	<u>m= 736</u>	<u>m= 868</u>
<u>+ 367</u>	<u>+ 120</u>	<u>+ 96</u>	<u>+ 186</u>	<u>+ 48</u>	<u>+ 48</u>
Vk= 26%	Vk= 5%	Vk= 4%	Vk= 10%	Vk= 7%	Vk= 6%

	1344				
	2240				
	1080				314
	2240				358
	1165				439
627	1792		1008	605	323
699	618	1523	923	627	483
788	1263	448	1057	609	394
645	1075	1559	914	645	536
717	1183	968	2580	609	430
<u>m= 695</u>	<u>m= 1400</u>	<u>m= 1125</u>	<u>m= 1296</u>	<u>m= 619</u>	<u>m= 410</u>
<u>+ 64</u>	<u>+ 792</u>	<u>+ 526</u>	<u>+ 720</u>	<u>+ 17</u>	<u>+ 78</u>
Vk= 9%	Vk= 57%	Vk= 47%	Vk= 56%	Vk= 3%	Vk= 19%

672	874		1008	1120	774
672	918		1120	237	736
753	985	600	2912	860	522
663	1120	636	3405	189	314
1326	1326	770	771	296	242
824	1129	734	824	1219	180
941	1048	932	1935	672	129
860	1263	1002	1640	430	124
931	1326	1344	1039	2150	96
824	1254	1398	896	466	116
<u>m= 847</u>	<u>m= 1124</u>	<u>m= 927</u>	<u>m= 1555</u>	<u>m= 764</u>	<u>m= 273</u>
<u>+197</u>	<u>+ 166</u>	<u>+308</u>	<u>+ 928</u>	<u>+606</u>	<u>+220</u>
Vk= 23%	Vk= 15%	Vk= 33%	Vk= 60%	Vk= 79%	Vk=80%

	860
2419	860
1434	1613
1183	726
<u>m= 1697</u>	<u>m= 1015</u>
<u>+ 653</u>	<u>+ 404</u>
Vk= 39%	Vk= 40%

Mittlere PRSC : $m = 1178 \pm 605$ ng/ml , $n = 20$

Mittelwert der Variationskoeffizienten : 31 ± 25 % , $n = 20$

Berechnung eines Mittelwertes (mit Standardabweichung, SD).

Tab. VI zeigt als Beispiel die Auswertung einiger mit dieser Methode ermittelten PRSC-Werte. Die mittlere PRSC betrug 1178 ± 605 ng/ml, $n = 20$. Die Genauigkeit dieser Messungen wurde als Variationskoeffizient für die einzelnen Plasmawerte angegeben. Dieser betrug im Mittel 31 ± 25 %.

4. Plasma-Converting enzyme-Aktivität (PCEA):

Die Bestimmung der PCEA erfolgte nach der modifizierten Methode von Piquilloud, Reinharz und Roth (53, 54).

Die Enzymaktivität ergibt sich aus der Reaktionsgeschwindigkeit der Umsetzung des synthetischen Substrats Benzyloxycarbonyl-Phe-His-Leu (Z-Phe-His-Leu / Fa. Bachem, Kalifornien), von dem das endständige His-Leu enzymatisch abgespalten wird. Durch die Reaktion des Dipeptids mit zugegebenem o-Phthaldialdehyd (Fa. Merck-Schuchard) entsteht eine Verbindung, deren Bildungsgeschwindigkeit fluorimetrisch gemessen wird und als Maß für die Converting enzyme-Aktivität dient.

Das Inkubationsmedium setzt sich aus Borax-Phosphatpuffer (0,05 M Borax, 0,1 M KH_2PO_4), darin gelöstem NaCl (1 %) und Z-Phe-His-Leu (2000 µg/ml Methanol) zusammen.

10 µl der zu testenden Probe werden zu 500 µl der Substrat-Pufferlösung zugesetzt, 1 h bei 37°C inkubiert und

die Reaktion durch Erhitzen im siedenden Wasserbad (5 min) und sofortiges Abkühlen im Eisbad gestoppt. Das enzymatisch abgespaltene Dipeptid His-Leu wird durch Zugabe von 50 μ l 4 M NaOH und 25 μ l o-Phthaldialdehyd (1 mg / 1 ml Methanol) umgesetzt und diese Reaktion nach 4 min mit 50 μ l 12 N HCl beendet. Das Endvolumen beträgt 635 μ l. Die Konzentration des fluoreszierenden His-Leu-Komplexes wird mit einem Fluorimeter bei 500 nm (Anregung: 365 nm) quantitativ bestimmt.

Die Reaktionszeit für die Umsetzung mit o-Phthaldialdehyd (4 min) wurde exakt eingehalten. Das Reaktionsprodukt kann nach einer zur Stabilisierung erforderlichen Wartezeit von 30 - 90 min fluorimetrisch gemessen werden.

Die PCEA wurde z.T. reaktionskinetisch bestimmt. Dazu werden entsprechend der Anzahl der Meßwerte größere Ansätze verwendet. In bestimmten Zeitintervallen wurden 10 μ l-Proben aus dem Inkubationsgemisch entnommen und nach obiger Beschreibung behandelt.

Wie schon für die Bestimmung des Plasma-Renins erläutert (s. Abschn. B,I,1), bietet die reaktionskinetische Messung den Vorteil, daß die Werte nur solange berücksichtigt werden, wie die Kurve linear verläuft (Abb. 12). Aus Tabelle VII sind einige Beispiele solcher reaktionskinetischer PCEA-Messungen zu ersehen, wobei alle Werte auf μ mol umgesetztes Enzymsubstrat (Z-Phe-His-Leu) pro min umgerechnet sind.

Die mittlere PCEA betrug $0,038 \pm 0,042 \mu\text{mol}/10 \mu\text{l}\cdot\text{min}$, $n = 10$. Die Genauigkeit der Messungen wird durch den

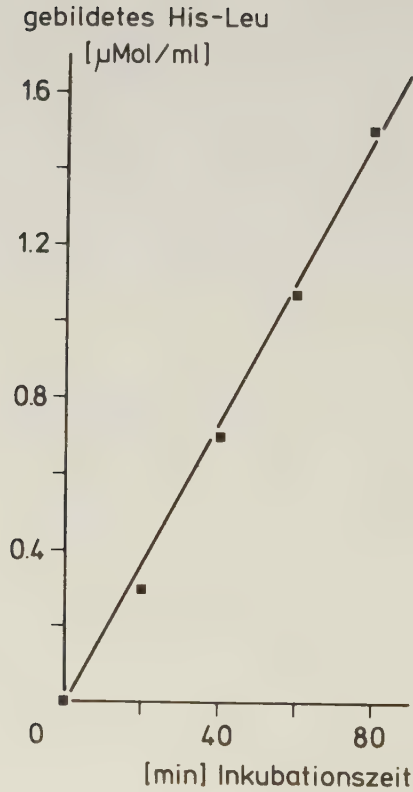


Abb. 12: Reaktionskinetische Messung der Converting enzyme-Aktivität im Plasma normaler Ratten. Abszisse: Inkubationszeit in min ; Ordinate: CE-Aktivität in $\mu\text{Mol/ml} \cdot \text{h}$.

Tabelle VII

Ergebnisse reaktionskinetischer Messungen
der PCEA

(Angaben in $\mu\text{mol}/10 \mu\text{l} \cdot \text{min}$; Messung nach Methode Piquilloud, Reinharz und Roth ; Variationskoeffizient = V_k)

		Vk im Mittel
0,070	0,040	
0,052	0,035	
0,047	0,026	
0,042	0,030	
<u>m= 0,053</u>	<u>m= 0,033</u>	
<u>+0,0097</u>	<u>+0,0018</u>	
Vk= 18%	Vk= 5%	Vk-MW: 12%

0,042	0,028	0,070
0,047	0,056	0,048
0,041	0,038	0,051
<u>m= 0,043</u>	<u>m= 0,041</u>	<u>m= 0,056</u>
<u>+0,0032</u>	<u>+0,014</u>	<u>+0,012</u>
Vk= 7%	Vk= 34%	Vk= 21%
		Vk-MW: 21%

0,020	0,032	0,040		
0,026	0,040	0,050	0,026	0,024
0,026	0,040	0,045	0,011	0,061
0,018	0,043	0,041	0,009	0,016
<u>m= 0,023</u>	<u>m= 0,039</u>	<u>m= 0,044</u>	<u>m= 0,015</u>	<u>m= 0,034</u>
<u>+0,0041</u>	<u>+0,0045</u>	<u>+0,0048</u>	<u>+0,009</u>	<u>+0,024</u>
Vk= 18%	Vk= 12%	Vk= 11%	Vk= 60%	Vk= 71%
				Vk-MW: 34%
				<u>m= 22$\pm$11%,</u>
				n= 3

Mittlere PCEA : $m = 0,038 \pm 0,042 \mu\text{mol}/10 \mu\text{l} \cdot \text{min}$, $n = 10$

Mittelwert der Variationskoeffizienten : $26 \pm 33 \%$,
 $n = 10$.

Variationskoeffizienten (prozentuale Standardabweichung) ausgedrückt. Ein mehrfach gewonnener Plasmawert zeigt innerhalb eines Meßvorgangs (Intraassay) einen mittleren Variationskoeffizienten von 26 ± 23 %. Ein Meßvorgang mit mehreren PCEA-Bestimmungen verschiedener Plasmen ergab einen mittleren Variationskoeffizienten von 22 ± 11 %.

5. Plasma-Angiotensinase-Aktivität (PaseA):

Die PaseA wurde reaktionskinetisch bestimmt über den Abbau des Angiotensin II bzw. Angiotensin II-amid (Hypertensin Ciba). Die jeweiligen Konzentrationen des Angiotensinase-Substrats (Angiotensin II bzw. Hypertensin) wurden mit Hilfe des Angiotensin-Rattentests ermittelt. Jeweils 0,1 ml Plasma und 0,1 ml Substratpuffer (150 ng A II / ml 0,15 M Phosphatpuffer, pH = 7,0) wurden eingesetzt.

Zunächst wurde im Rattentest die anfängliche Konzentration des Angiotensinase-Substrats bestimmt (vor Inkubationsbeginn). Anschließend wurde die Probe bei 37° C inkubiert, insgesamt etwa 60 min. Nach jeweils 10 min Inkubationszeit wurde eine Probe entnommen und im Rattentest der A II-Gehalt bestimmt. Daraufhin wurden die Meßpunkte graphisch

Tabelle VIII

Ergebnisse einiger PAsA-Messungen

(Angaben in min^{-1} ; Messung im Rattentest; Variationskoeffizient = V_k)

		Vk im Mittel
$\begin{array}{r} 0,0575 \\ 0,0806 \\ \hline m = 0,069 \\ \quad +0,016 \\ \hline V_k = 24 \% \end{array}$	$\begin{array}{r} 0,1666 \\ 0,1724 \\ \hline m = 0,169 \\ \quad +0,005 \\ \hline V_k = 3 \% \end{array}$	13 %
$\begin{array}{r} 0,0609 \\ 0,0806 \\ \hline m = 0,071 \\ \quad +0,014 \\ \hline V_k = 20 \% \end{array}$	$\begin{array}{r} 0,071 \\ 0,045 \\ \hline m = 0,058 \\ \quad +0,018 \\ \hline V_k = 32 \% \end{array}$	26 %
$\begin{array}{r} 0,0532 \\ 0,0515 \\ \hline m = 0,0524 \\ \quad +0,001 \\ \hline V_k = 2 \% \end{array}$	$\begin{array}{r} 0,058 \\ 0,047 \\ \hline m = 0,053 \\ \quad +0,008 \\ \hline V_k = 15 \% \end{array}$	9 %
$\begin{array}{r} 0,0794 \\ 0,0714 \\ \hline m = 0,075 \\ \quad +0,006 \\ \hline V_k = 8 \% \end{array}$		

$$\begin{array}{r} m = 16 \pm 9 \% \\ n = 3 \end{array}$$

Mittlere PAsA : $m = 0,078 \pm 0,041$, $n = 7$

Mittelwert der Variationskoeffizienten : $15 \pm 15 \%$,
 $n = 7$

dargestellt und derjenige Zeitpunkt als Halbwertszeit abgelesen ($T_{1/2}$), bei dem nur noch die Hälfte der anfangs enthaltenen A II-Konzentration vorhanden war. Der reziproke Wert der Halbwertszeit ($1/T_{1/2}$) gilt als Maß für die Ase-Aktivität.

Tabelle VIII zeigt als Beispiel die Ergebnisse einiger PAsa-Messungen. Die mittlere PAsa betrug $0,078 \pm 0,041 \text{ min}^{-1}$, $n = 7$.

Ein an einem Testtier doppelt bestimmter Wert (Intra-assay) wird mit einem mittleren Variationskoeffizienten von $15 \pm 15 \%$ gemessen. Bei PAsa-Bestimmungen in verschiedenen Plasmen normaler Ratten mit Hilfe von mehreren Testtieren ergab sich ein mittlerer Variationskoeffizient von $16 \pm 9 \%$.

II. Aktivitäts- bzw. Konzentrationsbestimmung der Komponenten des RAS in mikrodissezierten Glomeruli:

a. Isolierung der mikrodissezierten Glomeruli:

Bei den mit Inactin (100 mg/kg K.G., i.p.) narkotisierten Ratten wurde zunächst die Trachea katheterisiert und die A. iliaca kurz nach der Gabelung der Aorta freipräpariert. Nach Einführung eines Kunststoffkatheters wurde in die Arterie das Kontrastmittel Microfil (Silikon-Gummi, Canton Bio-Medical Products, USA) injiziert.

Das Microfil wurde durch Mischung folgender Bestandteile zubereitet:

4 ml liquid compound MV-117 orange (Silikon-Gummi)
5 ml liquid compound MV Diluent (Verdünnungsflüssigkeit)
0,3 ml MV Curent Agent (Katalysator).

In der Regel wurden die Nierengefäße abgeklemmt, wenn die Microfil-Füllung durch die Nierenkapsel hindurch sichtbar war. Daraufhin wurden die Nieren entnommen und sofort mit flüssigem Stickstoff abgekühlt.

Daran schloß sich eine etwa 12 h dauernde Gefrier Trocknung der Nieren an. Anschließend wurden einzelne Glomeruli mit den anhängenden afferenten Arteriolen mit feinen Nadeln unter einem Stereomikroskop disseziert und einzeln in einem eisgekühlten Eppendorf-Reaktionsgefäß aufbewahrt bzw. bis zur Messung eingefroren (-20°C).

b. Messung der Enzymaktivitäten bzw. -konzentrationen:

1. Glomerulärer Reningehalt:

Den einzelnen mikrodisssezierten Glomeruli wurde in einem Eppendorfgefäß hinzugefügt:

0,1 ml Ratten-Reninsubstrat (1000-2000 ng/ml 0,15 M Phosphatpuffer, pH 6,5 , Messung im Rattentest)

0,01 ml DFP 1:70 in Äthanol

0,01 ml Trasylol (50 000 E)

0,01 ml EDTA (20 mg/ml)

Nach einem kurzen Ultraschall-Aufschluß von 3 sec wurde das Gemisch 60 min lang bei 37° C inkubiert.

Anschließend wurde der glomeruläre Reningehalt mit Hilfe des Angiotensin-Rattentests bzw. des RIA für Angiotensin I bestimmt (s. Abschn. B,I,1). Der mittlere GR wurde jeweils aus 10 einzeln mikrodisssezierten und inkubierten Glomeruli bestimmt. In der Tabelle IX sind als Beispiel der mittlere GR und Einzelwerte für 19 normale Ratten angegeben. Der Reningehalt in verschiedenen Glomeruli derselben Niere war sehr unterschiedlich.

Der mittlere GR betrug $24,2 \pm 9,2$ ng/Glom.·h ; n = 19. Die Werte der einzelnen Nieren wurden mit einem mittleren Variationskoeffizienten von 74 ± 23 % bestimmt.

2. Glomeruläre Converting enzyme-Aktivität (GCEA):

Zur Bestimmung der GCEA waren jeweils 10 Glomeruli erforderlich, da im glomerulären Bereich eine relativ niedrige CE-Aktivität enthalten ist und die fluorimetrische Meß-

Tabelle IX

Ergebnisse einiger GR-Messungen

(Angaben in ng/Glom. • h ; Messung im RIA ;
Variationskoeffizient = Vk)

38,8	10,2	26,7	8,5	4,0	54,1	15,9
21,1	27,0	6,1	58,5	3,8	20,4	19,9
6,3	36,7	22,4	11,3	5,8	24,4	8,8
23,3	25,0	46,3	4,1	13,3	20,0	2,1
13,4	67,2	12,1	65,2	4,9	26,7	40,0
25,2	51,6	7,7	66,7	13,3	35,6	38,4
3,7	25,7	0,0	11,8	5,1	39,9	5,2
3,0	20,9	8,4	4,2	8,5	33,2	5,0
4,6	25,4	10,7	11,8	0,2	14,5	34,7
8,4	3,2	55,4	27,1	2,4	47,3	19,1
<u>m=14,8</u>	<u>m=29,3</u>	<u>m=19,6</u>	<u>m=26,9</u>	<u>m= 6,1</u>	<u>m=31,6</u>	<u>m=18,9</u>
<u>+11,9</u>	<u>+18,7</u>	<u>+18,3</u>	<u>+26,1</u>	<u>+4,3</u>	<u>+12,7</u>	<u>+14,3</u>
Vk=81%	Vk=64%	Vk=94%	Vk=97%	Vk=71%	Vk=40%	Vk=76%

3,6	11,2	12,9	5,8	13,2	52,2
48,3	57,8	8,8	6,0	39,0	5,9
12,6	58,4	13,2	31,4	56,9	6,2
42,4	13,0	9,5	43,6	7,2	11,8
35,6	16,5	3,2	7,5	11,8	3,2
29,8	23,4	3,3	8,0	28,9	5,6
24,5	19,9	12,7	5,6	77,5	8,0
23,3	5,8	2,9	27,8	63,1	4,9
109,6	40,7	10,0	12,0	18,2	4,9
13 4	33,2	9,8	5,0	61,5	6,6
<u>m= 34,3</u>	<u>m=28,0</u>	<u>m=15,3</u>	<u>m=15,3</u>	<u>m=37,7</u>	<u>m=10,9</u>
<u>+29,9</u>	<u>+18,9</u>	<u>+13,8</u>	<u>+13,8</u>	<u>+25,4</u>	<u>+14,7</u>
Vk= 87%	Vk=68%	Vk=91%	Vk=91%	Vk=67%	Vk=134%

25,6	6,3	38,7	35,7	38,7	26,9
9,7	27,4	20,8	57,2	46,4	20,1
45,7	23,0	26,5	39,3	40,3	26,7
18,6	14,1	34,1	25,4	56,7	62,9
45,9	8,1	57,5	33,6	65,1	0,0
9,5	13,2	48,5	15,6	7,2	26,4
2,7	15,2	23,3	25,6	39,7	35,7
19,8	23,3	20,0	24,3	9,8	67,6
22,5	47,4	40,8	12,1	28,4	24,6
9,3	19,2	14,3	51,6	31,2	13,0
<u>m=20,9</u>	<u>m=19,7</u>	<u>m=32,5</u>	<u>m=32,0</u>	<u>m=36,4</u>	<u>m=30,4</u>
<u>+14,9</u>	<u>+11,8</u>	<u>+13,9</u>	<u>+14,5</u>	<u>+18,3</u>	<u>+20,8</u>
Vk=71%	Vk=60%	Vk=43%	Vk=45%	Vk=50%	Vk=68%

Mittlerer GR : 24,2 $\pm$ 9,2 ng/Glom. • h ; n = 19

Mittelwert der Variationskoeffizienten: 74 $\pm$ 23 % ; n = 19

methode unempfindlicher ist als die radioimmunologische Reninmessung.

Den Glomeruli wurden 500 μ l Borax-Phosphatpuffer (pH = 8) hinzugefügt, der wie in Abschn. B,I,4 beschrieben angesetzt war und 1 % NaCl sowie Z-Phe-His-Leu als synthetisches CE-Substrat enthielt. Anschließend wurde 2 h bei 37° C inkubiert und wie in Abschn. B,I,4 beschrieben weiterverfahren.

Die Ergebnisse einiger GCEA-Messungen sind als Beispiel in Tabelle X angegeben. Die mittlere GCEA betrug $0,0302 \pm 0,024 \mu\text{mol/ml} \cdot \text{h}/10 \text{ Glom.}$, $n = 9$. Die Messungen hatten einen mittleren Variationskoeffizienten von $43 \pm 10 \%$, $n = 9$.

3. Glomeruläre Angiotensinase-Aktivität (GaseA):

Zur Bestimmung der GaseA waren für jede Einzelmessung 20 mikrodissesezierte Glomeruli erforderlich, obwohl diese Messungen mit dem sehr empfindlichen Angiotensin-Rattentest durchgeführt wurden. Daraus läßt sich bereits erkennen, daß die GaseA relativ niedrig ist.

Den mit Ultraschall homogenisierten Glomeruli wurde 0,1 ml 0,15 M Phosphatpuffer pH=7,7 (pH-Optimum der Asen) zugesetzt (11). Dazu wurde 0,1 ml Angiotensin II (150 ng/ml 0,15 M Phosphatpuffer pH=7,7) zugefügt.

Nach Bestimmung der Angiotensin II-Konzentration vor Inkubationsbeginn im Rattentest wurde die Probe 1 h bei 37° C inkubiert. Nach jeweils 10 min Inkubation wurde eine Probe entnommen und im Rattentest der A II-Gehalt bestimmt.

Tabelle X Ergebnisse einiger GCEA-Messungen

(Angaben in $\mu\text{mol/ml} \cdot \text{h}/10\text{Glom.}$; Messung modifiziert nach Methode Piquilloud, Reinharz und Roth)

0,0155	0,003	0,005	0,057	0,0335
0,0175	0,003	0,0045	0,0500	0,0725
0,004	0,006	0,002	0,0545	0,0385
0,018	0,0065	0,002	0,0965	0,0385
0,009	0,004	0,003	0,085	0,013
<u>m=0,013</u>	<u>m=0,005</u>	<u>m=0,003</u>	<u>m=0,069</u>	<u>m=0,039</u>
<u>+0,006</u>	<u>+0,002</u>	<u>+0,001</u>	<u>+0,021</u>	<u>+0,021</u>
Vk= 48%	Vk= 38%	Vk= 42%	Vk= 30%	Vk= 55%
0,059	0,023	0,01	0,02	Variations- koeffizient = Vk
0,0355	0,092	0,031	0,039	
0,020	0,04	0,01	0,031	
0,040	0,031	0,02	0,045	
0,040	0,045	0,028	0,052	
<u>m=0,039</u>	<u>m=0,046</u>	<u>m=0,020</u>	<u>m=0,037</u>	
<u>+0,014</u>	<u>+0,027</u>	<u>+0,01</u>	<u>+0,012</u>	
Vk= 36%	Vk= 58%	Vk= 49%	Vk= 33%	

Mittlere GCEA : $0,0302 \pm 0,024 \mu\text{mol/ml} \cdot \text{h}/10 \text{ Glom.}$, $n=9$

Mittelwert der Variationskoeffizienten: $43 \pm 10 \%$, $n=9$

Tabelle XI Ergebnisse einiger GAsE-Messungen

(Angaben in min^{-1} ; Messung im Rattentest)

0,02	0,03	0,03	0,03	0,02	0,002
0,02	0,03	0,04	0,03	0,03	0,009
0,01	0,06	0,03	0,03	0,02	0,031
0,02	0,05	0,03	0,03	0,02	0,024
<u>m=0,018</u>	<u>m=0,043</u>	<u>m=0,033</u>	<u>m=0,03</u>	<u>m=0,023</u>	<u>m=0,018</u>
<u>+0,005</u>	<u>+0,015</u>	<u>+0,005</u>	<u>+0</u>	<u>+0,005</u>	<u>+0,012</u>
Vk=27%	Vk=35%	Vk=15%	Vk=0%	Vk=21%	Vk=66%

Mittlere GAsE : $0,0275 \pm 0,014 \text{ min}^{-1}$; $n = 6$

Mittelwert der Variationskoeffizienten: $27 \pm 22 \%$, $n=6$

Bei graphischer Darstellung der Meßpunkte wurde die Halbwertszeit ($T/2$) abgelesen. Die reziproke Halbwertszeit diente als Maß für die Angiotensinase-Aktivität ($1/T/2$) (7).

Als Beispiele sind einige Werte der GaseA-Messung in Tabelle XI zusammengefaßt (Mittelwerte und Standardabweichung, SD). Die mittlere GaseA betrug $0,0275 \pm 0,014 \text{ min}^{-1}$, $n = 6$. Der mittlere Variationskoeffizient betrug $27 \pm 22 \%$.

C. Ergebnisse und Diskussion

I. Das Plasma- und glomeruläre RAS von unbehandelten

Ratten (Kontrollen):

An 17 (6 ♂, 11 ♀) Kontrollratten von 149-410 g Gewicht wurden verschiedene Komponenten des RAS im Plasma und in mikrodisssezierten Glomeruli mit anhängenden afferenten Arteriolen bestimmt. Der Tabelle XII sind die Einzelmeßwerte zu entnehmen. Die Auswertung dieser einzelnen Messungen ergab folgende Mittelwerte mit Standardabweichung:

Gewicht	g	191,9 ± 72,6	n = 14
PRA	ng/ml·h	10,1 ± 9,8	n = 12
PRC	ng/ml·h	47,0 ± 48,1	n = 12
PRSC	ng/ml	789,4 ± 324,5	n = 14
PCEA	µmol/ml·h	3,6 ± 2,8	n = 14
PaseA	min ⁻¹	0,1009 ± 0,015	n = 3
GR	ng/Glom·h	8,3 ± 5,9	n = 14
GCEA	µmol/Glom·h	0,028 ± 0,02	n = 14
GAseA	min ⁻¹	0,021 ± 0,014	n = 14
mittl.syst.RR	mm Hg	113,0 ± 18,3	n = 14
" diast.RR	mm Hg	106,0 ± 17,8	n = 14

Das Verhalten der verschiedenen RAS-Komponenten zueinander wurde durch Trendanalyse und Regressionsrechnung untersucht (55). Definitionsgemäß kann eine eindeutige Aussage über eine mathematische Abhängigkeit zwischen zwei Komponenten (mit der jeweiligen gewählten Irrtumswahrscheinlichkeit) nur dann gemacht werden, wenn sich eine

Tabelle XII

Normalratten

Nr.	Gewicht	Plasmawerte				Glomeruläre Werte			
		PRA	PRC	PaseA	PCEA	GCEA	GaseA	GR	PRSC
1	152	14,9	101,2		2,3	0,0045	0,008	4,26	903
2	153	10,5	30,3		1,8	0,0392	0,008	12,0	380
3	157	5,3	42,0		1,8	0,0462	0,008	5,68	1555
4	154	2,2	16,8		7,5	0,0198	0,003	2,54	527
5	157	3,5	16,3		1,0	0,0372	0,0282	3,61	860
6	161	1,7	20,7		1,6	0,0389	0,024	7,14	610
7	161				2,7	0,0686	0,008	2,81	976
8	161	28,1	85,0		2,6	0,0033	0,021	1,6	1197
9	165	14,3	21,1		2,2	0,0128	0,0252	13,10	410
10	278	10,5	58,9		4,2	0,0355	0,0518	6,55	810
11	149	28,1	164		6,8	0,0050	0,0372	19,78	482
12	220	1,5	5,5	0,109	2,6	0,0385	0,019	15,41	901
13	208			0,0827	10,7	0,0196	0,0172	16,53	589
14	410	0,8	2,1	0,111	2,9	0,0266	0,038	5,57	852
m=191,9 ± 72,56 n=14		m=10,1 ± 9,8 n=12	m=47,0 ± 48,1 n=12	m=0,1009 ± 0,015 n=3	m=3,62 ± 2,78 n=14	m=0,0283 ± 0,02 n=14	m=0,0212 ± 0,014 n=14	m=8,33 ± 5,89 n=14	m=789,4 ± 324,52 n=14

Systolischer RR : 113,0 ± 18,3 ; n = 14

Diastolischer RR : 106,0 ± 17,8 ; n = 14

signifikante Korrelation (z.B. Berechnung der Regressionsgeraden $y = ax + b$ und des Korrelationskoeffizienten r) ergibt. Der Korrelationskoeffizient ist indirekt über den Freiheitsgrad von der Fallzahl abhängig.

Da wir bei Messungen in Tierversuchen mit einer relativ großen Streuung der Meßwerte zu rechnen haben, die u.a. auf der individuellen Disposition der Versuchstiere (Stress) beruht, werden aus den gewonnenen Ergebnissen nur Tendenzen des Verhaltens der RAS-Komponenten zueinander zu erwarten sein.

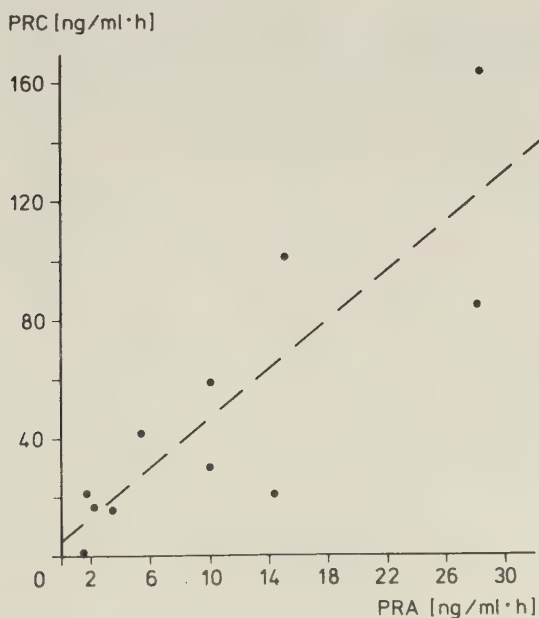


Abb. 13: Beziehung zwischen Plasma-Reninaktivität (PRA) und Plasma-Renin„konzentration“ (PRC) bei normalen (Kontroll-)Ratten. Abszisse: PRA in ng/ml·h ; Ordinate: PRC in ng/ml·h .

PRA und PRC waren signifikant miteinander korreliert ($p=0,001$, s.Abb. 13). Daraus ist ersichtlich, daß die PRA, die normalerweise von der PRC, der PRSC und anderen an der Plasma-A I-Bildung beteiligten Faktoren abhängig ist, im vorliegenden Fall auch als Maß für die PRC angesehen werden kann. Die Veränderung der anderen Parameter ist in unserem Fall von untergeordneter Bedeutung.

Für die Beziehung zwischen GR und PRC konnte keine signifikante Korrelation ermittelt werden. Dennoch zeigt Abb.14, daß ein Anstieg der PRC mit einer Abnahme des glomerulären

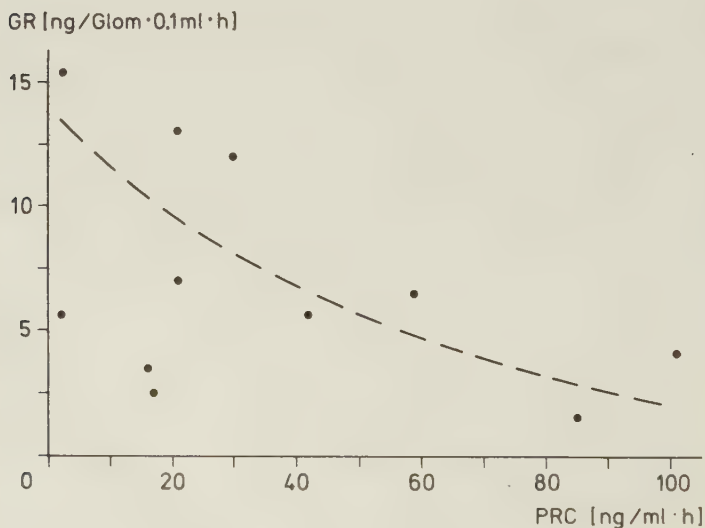


Abb. 14: Beziehung zwischen Plasma-Renin,,konzentration" und glomerulärem Reningehalt bei normalen (Kontroll-) Ratten. Abszisse: Plasma-Renin,,konzentration"(PRC) in ng/ml·h ; Ordinate: glomerulärer Reningehalt (GR) in ng/0,1ml·Glom.·h .

Renin-gehalts parallel läuft. Daraus ließe sich folgern, daß das Renin auf Kosten des glomerulären Gehalts zunehmend ins Plasma gelangt. Eine andere Erklärung für diese Erscheinung wäre der sog. „kurze Feedbackmechanismus“. Es ist allgemein bekannt, daß mit zunehmender Plasma-A II-Aktivität die renale Reninfreisetzung vermindert wird. Eine hohe PRC führt, soweit die PCEA ausreichend ist, zu einer hohen Plasma-A II-Aktivität, die eine Hemmung der glomerulären Reninfreisetzung und möglicherweise auch der Synthese zur Folge hat. Die Beziehung zwischen dem GR und der PRA verhielt sich gleichartig. Die Tendenz war jedoch etwas geringer ausgeprägt.

Da A II sehr stark vasokonstriktorisch wirkt und besonders den peripheren Widerstand der Blutgefäße erhöht, der durch die Größe des diast. Blutdrucks mit zum Ausdruck kommt, wurde die Abhängigkeit des diast. Blutdrucks von einzelnen Komponenten des RAS näher betrachtet.

In Abb. 15 ist der diastolische RR gegen die PRA aufgetragen. Bei kleinen Reninaktivitäten zeigt sich eine größere Streuung als bei höheren Werten. Es wurde festgestellt, daß bei den jüngeren Tieren die Abhängigkeit zwischen dem diast. RR und der PRA stärker ausgeprägt ist als bei den älteren Ratten, jedoch ließ sich hierfür keine Signifikanz oder statistische Auffälligkeit berechnen.

Der diast. RR ließ keinen Trend erkennen, vom GR abhängig zu sein. Auch in diesem Fall ist erkennbar, daß

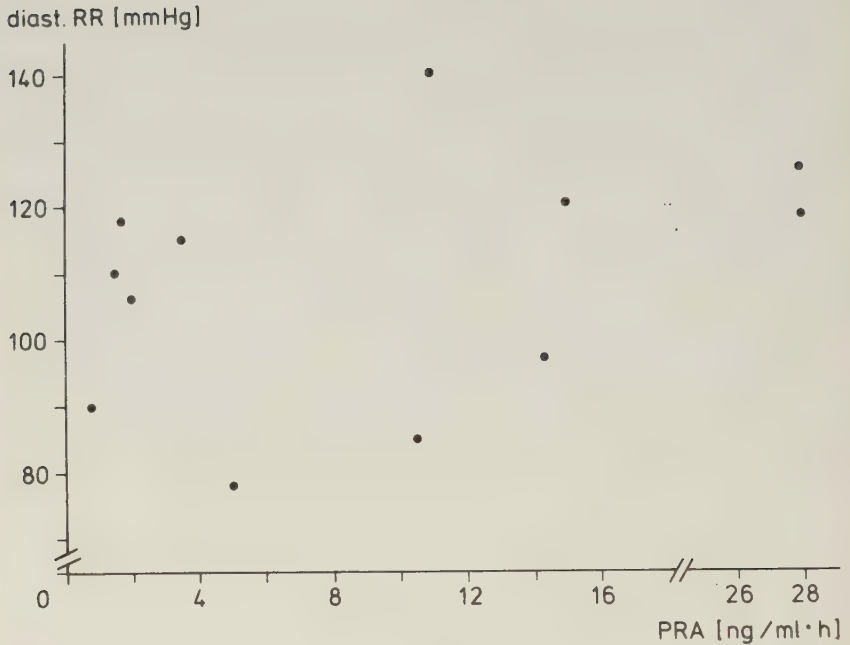


Abb. 15: Beziehung zwischen Plasma-Reninaktivität und diastolischem Blutdruck bei normalen (Kontroll-) Ratten. Abszisse: Plasma-Reninaktivität (PRA) in $\text{ng/ml}\cdot\text{h}$; Ordinate: diastolischer Blutdruck (RR) in mmHg.

der GR kaum die PRA widerspiegelt. Möglicherweise liegt ein Großteil des in den juxtaglomerulären Zellen enthaltenen Renins als inaktive oder weniger aktive Vorstufe des aktiven Enzyms vor.

Es ist allgemein bekannt, daß die PRSC mit steigendem Plasma-Renin abfällt. Man nimmt an, daß eine erhöhte PRA einen vermehrten Substratumsatz zur Folge hat und das Reninsubstrat nicht entsprechend schnell nachgebildet wird.

Die Abhängigkeit läßt sich auch daraus ersehen, daß nach bilateraler Nephrektomie die PRSC um das 5-15fache ansteigt (13). Die Tendenz zur Abnahme war aus unseren Ergebnissen für PRSC/PRA, PRSC/PRC und PRSC/GR kaum erkennbar. Möglicherweise ist die relativ große Streuung der PRA bzw. PRC als Ursache dafür anzusehen. Das Ziel weiterer Untersuchungen sollte es sein, diese Streuung herabzusetzen, was durch Verwendung von Geschwistertieren und schärfer definierten Versuchsbedingungen möglich sein sollte.

Die Abb. 16 zeigt das Verhalten PRSC/diast. RR in gra-

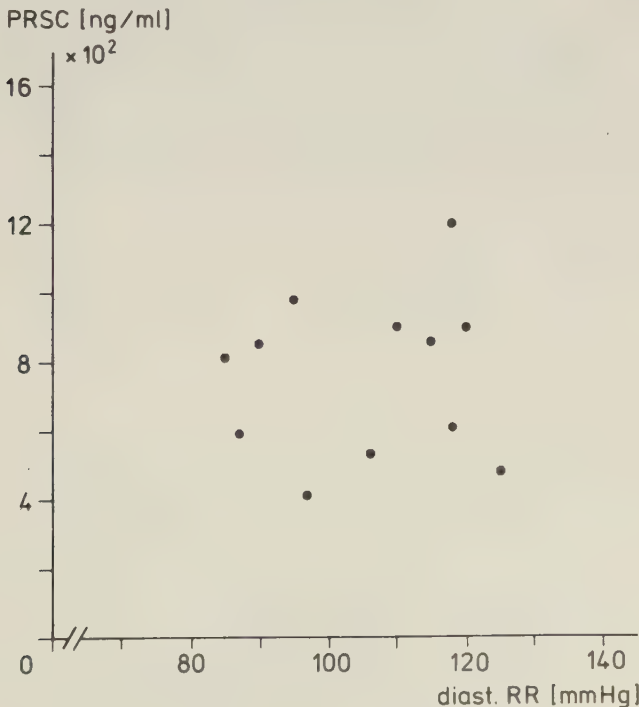


Abb. 16: Beziehung zwischen Plasma-Reninsubstratkonzentration und diastolischem Blutdruck bei normalen (Kontroll-) Ratten. Abszisse: diastolischer Blutdruck (RR) in mmHg ; Ordinate: Plasma-Reninsubstratkonzentration (PRSC) in ng/ml .

phischer Darstellung. Eine eindeutige Abhängigkeit läßt sich aus dem Diagramm nicht ersehen. Möglicherweise steigt der diast. RR mit abfallender PRSC.

In Abb. 17 ist die Abhängigkeit der GCEA von der PCEA dargestellt. Es muß darauf hingewiesen werden, daß es sich um zwei verschiedene Enzyme handelt, nämlich das in der Nierenrinde vorkommende Iso-Converting enzyme mit dem pH-Optimum zwischen 6,0 und 6,5 und dem Plasma-Converting enzyme, dessen pH-Optimum um pH=8,0 liegt (12).

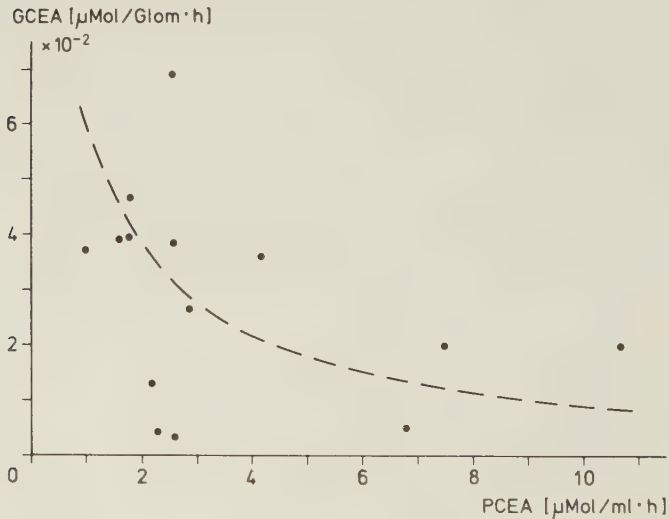


Abb. 17: Beziehung zwischen Plasma-Converting enzyme-Aktivität (PCEA) und glomerulärer Converting enzyme-Aktivität (GCEA) bei normalen (Kontroll-)Ratten.
Abszisse: PCEA in $\mu\text{Mol/ml}\cdot\text{h}$; Ordinate: GCEA in $\mu\text{Mol/Glom}\cdot\text{h}$.

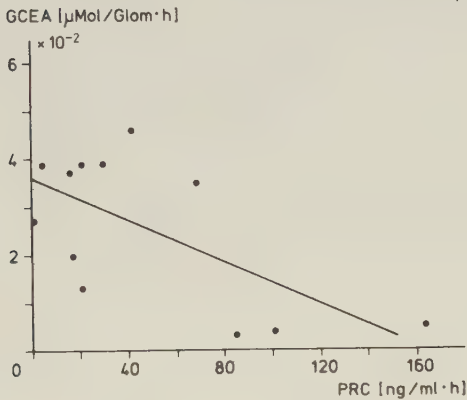
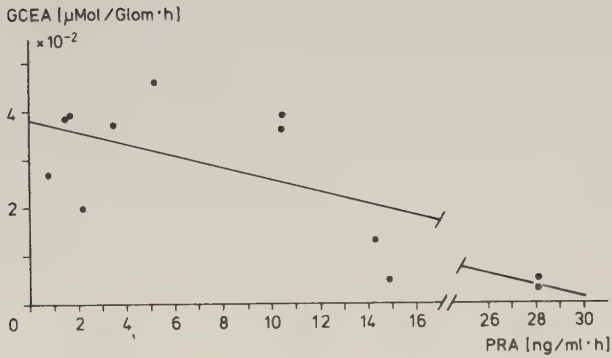


Abb. 18 a: Beziehung zwischen Plasma-Reninaktivität und glomerulärer Converting enzyme-Aktivität bei normalen (Kontroll-)Ratten. Abszisse: Plasma-Reninaktivität (PRA) in ng/ml·h ; Ordinate: glomeruläre Converting enzyme-Aktivität (GCEA) in μMol/Glom·h .

b: Beziehung zwischen Plasma-Renin„konzentration“ und glomerulärer Converting enzyme-Aktivität bei normalen (Kontroll-)Ratten. Abszisse: Plasma-Renin„konzentration“ (PRC) in ng/ml·h ; Ordinate: glomeruläre Converting enzyme-Aktivität (GCEA) in μMol/Glom·h .

Obwohl sich aufgrund der graphischen Darstellung eine Abhängigkeit vermuten läßt, konnte eine statistische Auffälligkeit (lineare Korrelation) mathematisch nicht ermittelt werden. Es sei jedoch darauf hingewiesen, daß bereits von Schweisfurth (56) ein ähnliches Verhalten beobachtet wurde. Es ist denkbar, daß durch die hohe PCEA eine vermehrte A II-Bildung hervorgerufen wird, die über einen glomerulären Rückkopplungsmechanismus zu einer Verminderung der glomerulären CE-Synthese führt.

Die PCEA zeigte keine signifikante Korrelation zu PRA bzw. PRC. Auch die GR ist weitgehend unabhängig von der PCEA.

Die Beziehung GCEA/PRA bzw. PRC zeigte dagegen signifikante Korrelation ($p=0,05$, s. Abb. 18 a und b). Eine Verminderung der GCEA sollte zu einer geringeren A II-Aktivität führen; hierdurch wird - über den sog. kurzen Feedbackmechanismus - die Reninfreisetzung stimuliert, daher sind PRA bzw. PRC erhöht. Man kann daher vermuten, daß die PRA auch von dem Nieren-CE abhängig ist. Die Frage bleibt, unter welchen physiologischen Bedingungen dieses von Bedeutung ist.

Für die Auftragung der GCEA in Abhängigkeit vom GR könnte man einen hyperbelartigen Abfall interpretieren (Abb. 19), jedoch konnte keine Signifikanz (lineare Korrelation) ermittelt werden. Mit steigender GCEA sollte die glomeruläre A II-Bildung stimuliert werden, was zu einer Verminderung der glomerulären Reninfreisetzung

führen könnte. Es ist bislang nicht bekannt, ob sich die Höhe der glomerulären Reninfreisetzung aus dem glomerulären Reningehalt erkennen läßt. In diesem Fall wäre der GR ein Maß für die glomeruläre Reninfreisetzung. Weitere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, die unter andersartigen Bedingungen durchgeführt wurden, sprechen aber dagegen.

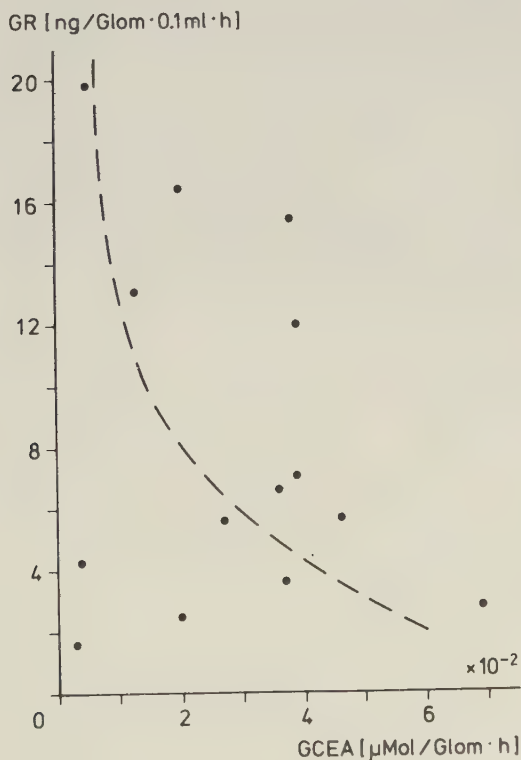


Abb. 19: Beziehung zwischen glomerulärer Converting enzyme-Aktivität und glomerulärem Reningehalt bei normalen (Kontroll-)Ratten. Abszisse: glomeruläre Converting enzyme-Aktivität (GCEA) in μ Mol/Glom·h; Ordinate: glomerulärer Reningehalt (GR) in ng/0.1ml·Glom·h.

Über das Verhalten der Angiotensinasen (Asen) läßt sich aus der Literatur nur wenig entnehmen. Daher wurden die Beziehungen zwischen einigen Plasma- und glomerulären Komponenten des RAS und den Asen näher untersucht.

Das Verhältnis der PAsE/GAsE konnte leider nicht systematisch untersucht werden, da nicht genügend Blut dafür zur Verfügung stand. Die Blutentnahme ist dadurch limitiert, daß das RAS (PRA und PCEA) sehr schnell auf Blutvolumenveränderungen reagiert.

Es ergibt sich keine Korrelation der GAsE zu Plasma-Reninwerten. Während die GAsE vom Plasma-Renin unabhängig zu sein scheint, könnte man einen steilen Abfall für die Auftragung des GR gegen die GCEA annehmen (Abb. 20), jedoch muß man auf jeden Fall die relativ große Streuung der Meßwerte berücksichtigen. Eine hohe GAsE bewirkt einen vermehrten A II-Abbau. Die Verminderung des glomerulären A II-Spiegels könnte die Stimulierung der Reninfreisetzung zur Folge haben. Unter der Annahme, daß Renin vermehrt aus dem Glomerulus abgegeben wird (s. Abb. 14), ließe sich der Abfall des GR erklären. In diesem Fall sind glomeruläre Reninfreisetzung und glomerulärer Reningehalt invers abhängig. Das läßt erkennen, daß unsere Annahme der alleinigen Beteiligung des sog. „kurzen Feedbackmechanismus“ bei diesen Untersuchungen nicht ausreicht, sondern weitere, uns bislang unbekannte Mechanismen beteiligt sind.

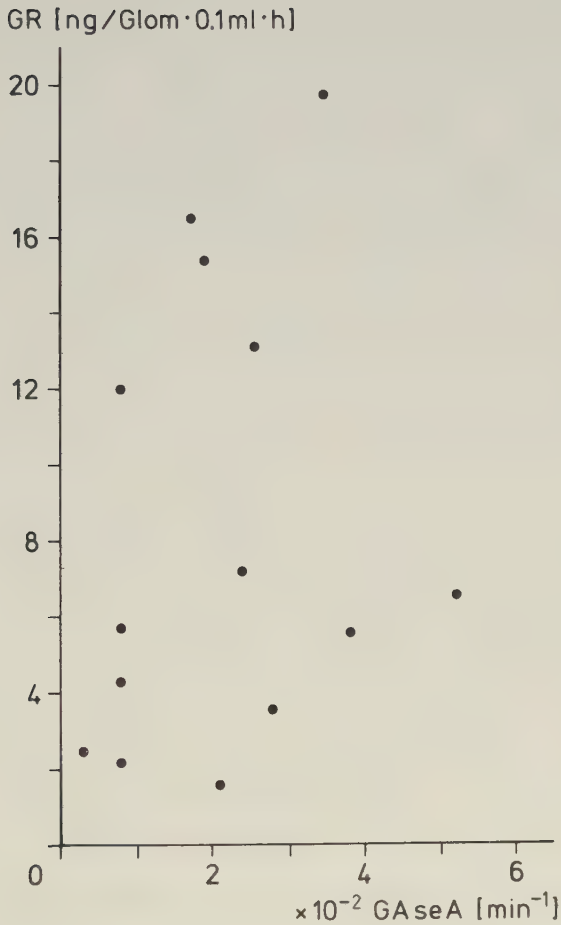


Abb. 20: Beziehungen zwischen glomerulärer Angiotensinase-Aktivität und glomerulärem Reningehalt bei normalen (Kontroll-)Ratten. Abszisse: glomeruläre Angiotensinase-Aktivität (GaseA) in min⁻¹; Ordinate: glomerulärer Reningehalt (GR) in ng/0,1ml·Glom.·h.

II. Das Verhalten des Plasma- und glomerulären RAS nach Applikation des Angiotensin II-Antagonisten Saralasin (Sar-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Ala):

Bekanntlich wird durch Herabsetzung des Plasma-Angiotensin II-Spiegels die Reninfreisetzung stimuliert. Mit den nachfolgend beschriebenen Untersuchungen sollte herausgefunden werden, wie sich die verschiedenen glomerulären und Plasma-RAS-Komponenten nach der Verabreichung des A II-Antagonisten Saralasin verhalten. Das besondere Interesse galt der Einwirkung des Saralasins auf die glomeruläre Reninfreisetzung.

Die Messungen wurden an 27 (13 ♂, 14 ♀) Ratten von 150-420 g Gewicht durchgeführt, wobei die Plasmawerte bei einer Gruppe der Ratten (A: n=15) nur nach Applikation des A II-Antagonisten (Kontrollen: s.u.), bei einer zweiten Gruppe (B: n=12) vor und nach i.v.-Gabe des Saralasins (23,8-172,0 µg/kgKG·h, Dauer: 1 h) bestimmt wurden. Teilweise konnten nicht alle Parameter bestimmt werden, da in diesen Fällen zu kleine Blutmengen zur Verfügung standen.

Meßgruppe A: Messung der Plasma- und der glomerulären Werte nach Saralasingabe. Als Kontrollen dienten die Ergebnisse der unbehandelten Normalratten (s. Abschn. C,I).

Meßgruppe B: Messung der Plasmawerte vor (B_0) und nach (B_1) Saralasingabe.

Die Meßergebnisse für die einzelnen Tiere sind aus den Tabellen XIII-XV zu ersehen.

Tabelle XIII

Meßwerte im Plasma nach Saralasingabe — Gruppe A

Ratte Nr.	Gewicht [g]	PRA [ng/ml·h]	PRC [ng/ml·h]	PRSC [ng/ml]	PAseA [min ⁻¹]	PCEA [μmol/ml·h]
1	154	44,1	119,7	550	---	6,9
2	153	4,2	7,7	760	---	8,4
3	157	58,8	195,6	---	---	6,9
4	173	---	---	407	---	6,0
5	164	---	---	400	---	2,8
6	164	---	---	554	---	6,7
7	157	---	---	564	---	7,0
8	196	24,8	105,3	766	---	9,0
9	153	---	---	808	---	8,4
10	154	6,3	23,6	537	---	11,2
11	176	42,4	171,4	736	---	4,9
12	150	70,4	596,3	513	---	4,9
13	152	16,7	232,5	558	---	6,0
14	152	27,7	199,7	841	---	4,5
15	s.Tab. XIV	10,6	22,2	s.Tab. XIV	---	s.Tab. XIV
16	320	21,6	83,6	1098	0,053	9,8

Die Tabelle XIII enthält die Angaben für die Plasmakomponenten der Meßgruppe A (Ratte Nr. 1 - 16) nach Saralasininfusion. Die statistische Auswertung der Tabelle XIII brachte folgende Ergebnisse (Mittelwerte und Standardabweichung, SD):

Gewicht	g	171,7 $\pm$ 42,9	n = 15
PRA	ng/ml·h	29,8 $\pm$ 21,7	n = 11
PRC	ng/ml·h	159,8 $\pm$ 164,3	n = 11
PRSC	ng/ml	649,4 $\pm$ 192,8	n = 14
PCEA	μ mol/ml·h	6,9 $\pm$ 2,2	n = 15
PAseA	min ⁻¹	0,053	n = 1

Die PRA (Gruppe A) war im Vergleich zu den normalen Tieren signifikant erhöht (2p= 0,01 ; Werte der normalen Tiere s. Abschn. C,I). Ebenso war die PRC statistisch auffällig größer (2p= 0,05) als die PRC der normalen Tiere.

Außerdem erwies sich die PCEA (Gruppe A) als hoch signifikant (2p= 0,001) erhöht gegenüber den Kontrollratten.

Aus Tabelle XIV sind die Werte für die Tiere zu entnehmen, bei denen die Plasma-Bestimmungen vor und nach Saralasinapplikation durchgeführt wurden (Gruppen B₀ und B₁: Ratten Nr. 15 - 27). Die statistische Auswertung ergab folgende Werte (Mittelwerte und Standardabweichung, SD):

Gewicht (B ₀ ,B ₁)	g	273,8 $\pm$ 73,9	n = 12
Werte vor Saralasingabe (B ₀)	Werte nach Saralasingabe (B ₁)		
PRA ng/ml·h	18,2 $\pm$ 35,4	73,1 $\pm$ 79,2	n = 10
PRC ng/ml·h	26,2 $\pm$ 69,2	98,4 $\pm$ 227,5	n = 10
PRSC ng/ml	1452,7 $\pm$ 678,7	1324,9 $\pm$ 640,9	n = 11
PCEA μ mol/ml·h	5,4 $\pm$ 3,4	6,1 $\pm$ 3,0	n = 12
PAseA min ⁻¹	0,1043 $\pm$ 0,043	0,1050 $\pm$ 0,0554	n = 11

Tabelle XIV

Meßwerte im Plasma vor und nach Saralasingabe
(Dimensionen wie in Tabelle XIII)

Ratte Nr.	Gewicht	PRA		PRC		PRSC		PASEA		PASEA		PCEA		PCEA	
		S _{vor}	S _{nach}	S _{vor}	S _{nach}	S _{vor}	S _{nach}	S _{vor}	S _{nach}	S _{vor}	S _{nach}	S _{vor}	S _{nach}	S _{vor}	S _{nach}
15	320	---	s.Tab. XIII	---	s.Tab. XIII	1689	1518	---	---	---	---	2,8	4,2		
17	262	11,9	128,9	25,0	165,8	1350	1185	0,058	0,068	10,0	10,3				
18	302	118,0	264,0	222,0	730,0	1393	1289	0,170	0,027	12,3	11,9				
19	210	---	---	---	---	---	---	0,038	0,044	5,0	5,6				
20	230	0,9	11,7	3,7	41,6	737	688	0,156	0,155	5,9	7,3				
21	220	1,5	7,1	5,5	12,8	868	652	0,152	0,194	5,1	4,6				
22	232	1,1	1,0	1,9	4,2	695	787	0,103	0,139	1,2	3,4				
23	256	11,7	85,8	1,3	14,7	1390	1028	0,090	0,074	9,0	8,7				
24	293	11,7	27,5	0,5	1,8	2765	2706	0,113	0,155	2,3	2,7				
25	380	9,5	40,7	0,5	2,0	850	898	0,091	0,064	3,9	4,8				
26	420	6,6	88,0	0,7	3,9	2371	2046	0,056	0,083	2,9	2,4				
27	160	8,8	75,9	0,7	6,8	1872	1777	0,121	0,152	4,7	7,4				

Die statistische Auswertung erfolgte für den paarweisen Vergleich zwischen B_0 und B_1 mittels t-Test für verbundene Stichproben (Prüfung des Mittelwertes der Paardifferenzen auf Null) bzw. Wilcoxon-Vorzeichentest, während für den Vergleich mit den Normalratten der t-Test nach Student für unverbundene Stichproben verwendet wurde.

Die PRA vor Saralasingabe (Gruppe B_0) war nicht signifikant verschieden von dem Wert der Normalratten (Werte s. Abschnitt C,I). Die PRA erhöhte sich durch die Saralasingabe signifikant im Vergleich zum Kontrollwert vor der Infusion ($2p=0,005$).

Auch die PRC vor der Saralasinapplikation (B_0) unterschied sich nicht signifikant von der der Normalratten (s. Abschn. C,I). Die PRC nach Saralasingabe (B_1) war signifikant höher als vor der Applikation des Antagonisten (B_0 ; $2p= 0,01$, Anwendung des Wilcoxon-Vorzeichentests).

Die PRSC vor Saralasin (B_0) war dagegen höher als bei den Kontrollratten ($2p= 0,005$). Auch nach der Saralasingabe (B_1) wurde noch eine signifikante Erhöhung ($2p= 0,02$) im Vergleich zu den Normalratten festgestellt.

Durch die Saralasinapplikation wurde die PRSC (B_1) gegenüber den Werten vor der Infusion (B_0) signifikant erniedrigt ($2p= 0,01$). Dieses steht im Einklang mit den PRA- bzw. PRC-Werten. Wahrscheinlich ist die Verminderung der PRSC eine Folge des erhöhten Plasma-Reningehalts, da dieser einen vermehrten Substratumsatz verursacht. Die signifikant unter-

schiedlichen PRSC-Werte zwischen den beiden unbehandelten Rattengruppen (B_0 und Kontrollgruppe) könnten durch den Gewichts-(Alters-)Unterschied der Ratten über die davon abhängenden PRC-Werte verursacht worden sein. Bekanntlich verringert sich die PRC mit zunehmendem Alter (Gewicht). Bei den schwereren Ratten wurde eine geringere PRC (26,2 ng/ml · h) gemessen, was die relativ hohen Werte der PRSC erklären könnte.

Eine Einwirkung des Saralasin auf die PAseA konnte von uns nicht festgestellt werden.

Die Saralasininfusion bewirkte eine statistisch auffällige Erhöhung der PCEA ($2p = 0,05$) beim Vergleich zu den Werten vor der Applikation. Auch gegenüber den Normalratten (Kontrollgruppe) war die PCEA nach der Saralasingabe (B_1) auffällig erhöht ($2p = 0,05$).

Während die Verminderung der PRSC durch die Saralasingabe durch die Stimulierung der PRC erklärt werden kann, ist die Einwirkung auf die PCEA nicht ohne weiteres zu deuten. Es wäre denkbar, daß das Reaktionsprodukt des CE, das A II, die PCEA beeinflußt. Da allgemein vermutet wird, daß das Plasma-Converting enzyme aus den Lungenepithelien freigesetzt wird, könnten A II-Rezeptoren (die an dem Mechanismus der CE-Freisetzung beteiligt sind) in diesen Strukturen angenommen werden. Die vorliegenden Befunde legen die Annahme nahe, daß eine Erhöhung der Plasma-A II-Aktivität die Freisetzung des Plasma-CE vermindert. Der A II-Antagonist würde

nach seiner Bindung an den postulierten A II-Rezeptoren eine verminderte Plasma-A II-Aktivität vortäuschen, was zu der beobachteten Erhöhung der PCEA führen könnte. Die Freisetzung des pulmonalen CE ins Plasma würde also durch das Reaktionsprodukt dieses Enzyms, das A II, beeinflußt. - Bekanntlich inhibiert das Oktapeptid A II auch die renale Renin-Freisetzung. Es ist denkbar, daß dieser Mechanismus unter Beteiligung des renalen CE abläuft. In diesem Fall kann man annehmen, daß die Freisetzung des glomerulären CE mit ansteigendem A II vermindert wird, wodurch es lokal zu einer Erhöhung des A I, des CE-Substrats, kommt. Da A I das Reaktionsprodukt des Renins ist, könnte man auch in diesem Fall eine direkte Produkthemmung vermuten.

Tabelle XV enthält die Einzelmeßwerte der glomerulären Komponenten des RAS nach Saralasingabe. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind folgende (Mittelwerte und Standardabweichung, SD):

GR	ng/0,1 ml·h	7,4 $\pm$ 8,1	n = 27
GCEA	$\mu\text{mol/ml}\cdot\text{h}\cdot 10\text{JGA}$	0,0347 $\pm$ 0,0313	n = 27
GAseA	min^{-1}	0,0359 $\pm$ 0,0230	n = 27

Der GR der Ratten nach Saralasingabe zeigte keinen Unterschied zu dem der Normalratten (s. Abschn. C,I). Jedoch ist wegen der relativ großen Streuung der Meßwerte eine Saralasin-einwirkung auf den GR nicht auszuschließen. Untersuchungen an mit einer Nährlösung überströmten isolierten Glomeruli zeigten eine signifikante Stimulierung der glomerulären Renin-freisetzung nach Saralasinapplikation (21).

Tabelle XV

Messungen der glomerulären Komponenten nach Saralasingabe

Ratte Nr.	GCEA [$\mu\text{mol}/0,1\text{ml}\cdot\text{h}$]	GAseA [min^{-1}]	GR [$\text{ng}/0,1\text{ml}\cdot\text{h}$]
1	0,0204	0,0422	7,30
2	0,0155	0,0290	4,21
3	0,0090	0,0188	16,99
4	0,0200	0,0140	26,02
5	0,0244	0,0240	29,37
6	0,1030	0,0403	3,28
7	0,0430	0,0266	28,51
8	0,0240	0,0367	9,12
9	0,0010	0,0314	10,20
10	0,0136	0,0296	4,43
11	0,1186	0,0415	5,43
12	0,0158	0,0090	5,38
13	0,0199	0,0215	0,82
14	0,0366	0,0122	2,18
15	0,0195	0,0613	1,71
16	0,0243	0,0270	2,25
17	0,0190	0,0360	1,34
18	0,0306	0,0684	4,51
19	0,0144	0,0280	3,86
20	0,0159	0,0100	6,02
21	0,0080	0,0789	2,78
22	0,0410	0,0129	1,74
23	0,0430	0,0133	4,64
24	0,0150	0,0244	2,66
25	0,0770	0,0610	6,60
26	0,1040	0,0860	6,04
27	0,0600	0,0845	2,63

Es ist auch denkbar, daß das Renin in den juxtaglomerulären Zellen, dem Syntheseort, in einer weniger aktiven Form vorliegt, die erst bei der Enzymfreisetzung oder später aktiviert wird. Die Existenz einer weniger aktiven Vorstufe des Renins wird heute von mehreren Autoren angenommen (2,38,57).

Die GCEA unterschied sich nach der Saralasininfusion ebenfalls nicht signifikant vom Kontrollwert. Auch in diesem Fall ist möglicherweise eine Einwirkung des Antagonisten wegen der relativ großen Streuung der Meßwerte nicht erkennbar. Es sei nochmals darauf hingewiesen, daß die glomerulären Enzymbestimmungen an einzelnen oder nur an 10 Glomeruli durchgeführt wurden. Diese Mikrobestimmungen sind, wie zu erwarten, mit einem größeren prozentualen Fehler behaftet. Kontrollen für die glomerulären Enzymaktivitäten können nur an anderen Tieren durchgeführt werden. Es wäre vorteilhaft, in Zukunft Geschwistertiere zum Vergleich zu verwenden, um die biologische Streuung herabzusetzen.

Die GaseA war nach der Saralasinapplikation statistisch auffällig höher ($2p = 0,05$) als bei den Normalratten (Kontrollgruppe). Untersuchungen an der ischämischen Ratten- niere zeigten bei erhöhten glomerulären Renin- und CE-Aktivitäten, die zu einer verstärkten A II-Bildung führen sollten, eine verminderte GaseA (11), die zu einem weiteren Anstieg des A II-Spiegels führen sollte. Berücksichtigt man, daß die GaseA bei der Erhöhung des lokalen A II, ihres Substrats, vermindert wird, und daß die GaseA nach Saralasin-

gabe ansteigt, so läßt sich vermuten, daß A II die GaseA beeinflussen kann. Jedoch sind unbedingt weitere Untersuchungen erforderlich.

Die statistische Auswertung der mittleren systolischen und diastolischen Blutdrucke bei den Gruppen B_0 und B_1 ergab:

	vor Saralasin (B_0)	nach Saralasin (B_1)	
syst. RR	129,7 $\pm$ 20,6	110,8 $\pm$ 27,0	n = 27
diast. RR	104,2 $\pm$ 21,5	86,6 $\pm$ 27,2	n = 27

Bei Vergleich der beiden unbehandelten Rattenkollektive (B_0 und Kontrollgruppe) ergab sich für die Gruppe B_0 ein höherer systolischer Blutdruck ($2p = 0,025$).

Der systolische RR wurde durch die Saralasingabe signifikant erniedrigt ($2p = 0,0025$).

Der diastolische RR vor Saralasingabe (B_0) war vom diast. RR bei den Kontrollratten nicht signifikant verschieden. Auch der diast. RR wurde durch den A II-Antagonisten erniedrigt ($2p = 0,005$) und war dann auch signifikant niedriger als der diast. RR bei den Kontrollratten ($2p = 0,0025$).

Die Beziehungen einiger RAS-Komponenten zueinander wurden vor und nach der Saralasingabe in Trendanalyse und Regressionsrechnung näher untersucht (s.a. Abschn. C,I). Insbesondere wurde darauf geachtet, ob sich das Verhalten der RAS-Komponenten durch die Saralasinapplikation veränderte und ob sich die Beziehungen der RAS-Komponenten zueinander nach der Saralasinapplikation von denen der normalen Kontrollratten unterscheiden.

Für die Beziehung PRC/GR ergab sich bei den Rattenkollektiven A und B keine signifikante Korrelation. Im Gegensatz zu den Normalratten, bei denen mit zunehmender PRC ein Abfall des GR beobachtet wurde, waren die GR-Werte nach der Saralasinwirkung von der PRC unabhängig. Daraus könnte man entnehmen, daß die Wechselwirkung zwischen diesen beiden Komponenten durch den Antagonisten beeinflusst wird.

Die Beziehung PRSC/PRA ließ keine Abhängigkeit erkennen. Bei der Beziehung PRSC/PRC könnte für die Gruppe B (bei Vergleich B_0 und B_1) eine Tendenz zur Abnahme der PRSC mit zunehmender PRC interpretiert werden; eine Wirkung des Saralasins läßt sich daraus jedoch nicht herleiten.

Die PRSC war in beiden Gruppen (A und B) vom GR unabhängig, wie das auch bei den Normalratten zu erkennen war.

In Abb. 21 ist die PCEA gegen GCEA (A und B) aufgetragen. Es ließ sich ein dem Verhalten der Normalratten ähnlicher Befund erkennen. Man kann annehmen, daß die Saralasinwirkung keinen wesentlichen Einfluß auf die Wechselwirkung des CE zwischen Plasma und Glomerulus ausübt. Wahrscheinlich wird das Verhalten des Plasma-Converting enzyme durch die Enzymfreisetzung aus der Lunge geprägt.

Die GCEA war nach Saralasingabe (A und B) von der PRA unabhängig - im Gegensatz zur signifikanten Korrelation dieser Komponenten bei den Kontrollratten. Auch dieser Befund kann als Anzeichen dafür gesehen werden, daß die Converting enzyme-Aktivität vom A II beeinflusst wird.

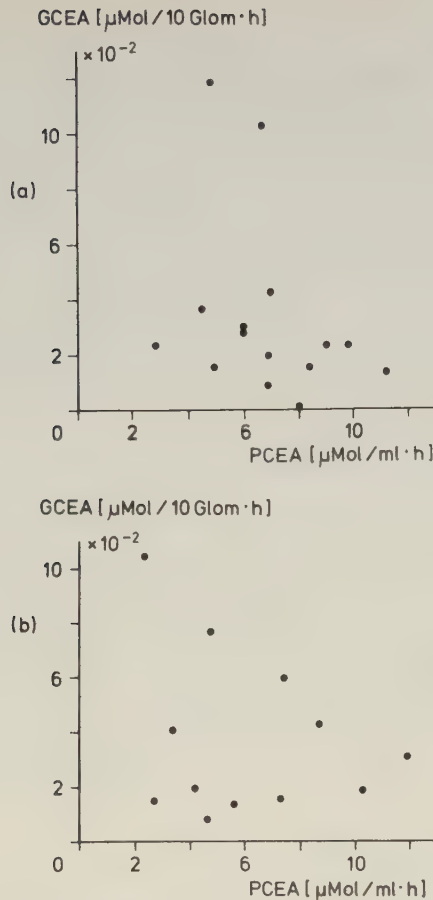


Abb. 21: Darstellungen von Plasma-Converting enzyme-Aktivität und glomerulärer Converting enzyme-Aktivität bei Saralasin-behandelten Ratten.
Abb. a: Gruppe A Abb. b: Gruppe B₁
Abszisse: Plasma-Converting enzyme-Aktivität in $\mu\text{Mol/ml}\cdot\text{h}$; Ordinate: glomeruläre Converting enzyme-Aktivität in $\mu\text{Mol/10 Glom}\cdot\text{h}$.

Auch die Beziehung GCEA/PRC ließ bei Gruppe A keine Abhängigkeit erkennen, bei Gruppe B zeigte sich lediglich eine geringe Übereinstimmung zum Verhalten bei Normalratten,

jedoch konnte keine Signifikanz ermittelt werden.

Dagegen zeigte die Beziehung GCEA/GR ein ähnliches Verhalten wie bei den Normalratten (s. Abb. 19).

Da bei den unbehandelten Kontrollratten die Plasma-Angiotensinasen nur in wenigen Fällen gemessen werden konnten, müssen die vor Saralasinapplikation ermittelten Werte (Gruppe B₀) allein als Kontrollen dienen.

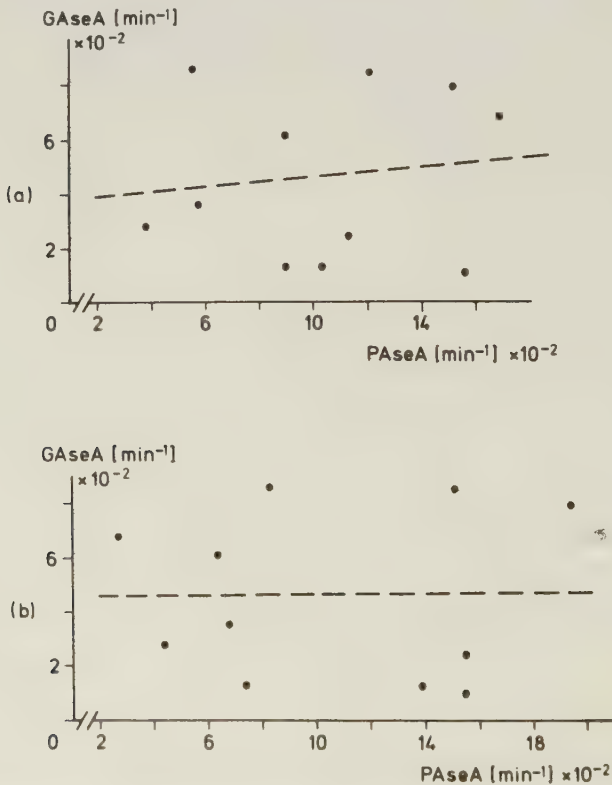


Abb. 22 a: Beziehung zwischen Plasma-Angiotensinase-Aktivität und glomerulärer Angiotensinase-Aktivität bei Saralasin-behandelten Ratten (Gruppe B₀). Abszisse: Plasma-Angiotensinase-Aktivität (PAsE A) in min⁻¹; Ordinate: glomeruläre Angiotensinase-Aktivität in min⁻¹.

b: Beziehung zwischen PAsE A und GAsE A bei Saralasin-behandelten Ratten (Gruppe B₁). Abszisse: PAsE A in min⁻¹; Ordinate: GAsE A in min⁻¹.

Die PAs_{EA} war vor und nach Saralasingabe von der GAs_{EA} unabhängig (Abb. 22). Da bekanntlich die GAs_{EA} recht niedrig ist und im Plasma eine relativ hohe Anzahl von Angiotensinasen enthalten ist, war die Unabhängigkeit beider Größen voneinander zu erwarten.

Mit ansteigendem Gewicht ließ sich sowohl vor als auch nach Saralasingabe (A und B) ein leichter Abfall der PAs_{EA} beobachten.

Während die Beziehung PRA/PAs_{EA} vor Saralasin (B₀) nur eine leichte Abnahme der PAs_{EA} mit zunehmender PRA ergab, konnte nach Applikation des Antagonisten eine Signifikanz dafür ermittelt werden (Abb. 23).

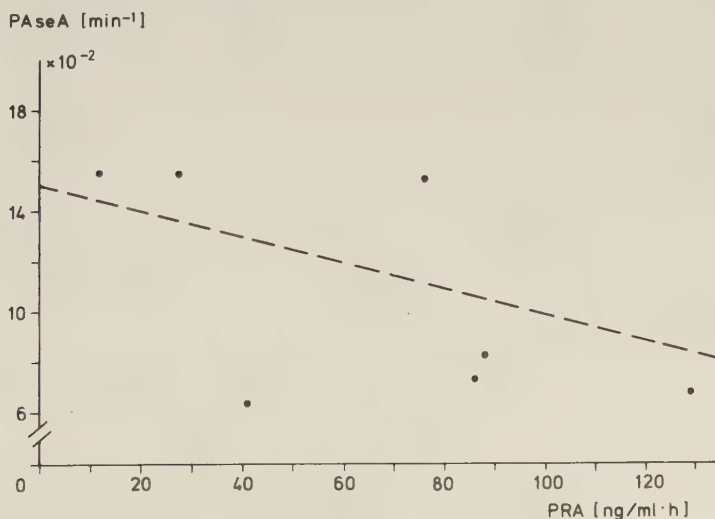


Abb. 23: Beziehung zwischen Plasma-Reninaktivität und Plasma-Angiotensinase-Aktivität bei Saralasin-behandelten Ratten (Gruppe B₁).
Abszisse: Plasma-Reninaktivität (PRA) in ng/ml·h;
Ordinate: Plasma-Angiotensinase-Aktivität in min⁻¹.

Dagegen war die PAsEa vor und nach Saralasingabe (B_0 , B_1) von der PRC unabhängig, während sie mit steigendem GR ebenfalls leicht abfiel, wofür jedoch keine Signifikanz ermittelt werden konnte.

Die Beziehung PAsEa/diast. RR vor Saralasin (B_0) ließ keine Abhängigkeit erkennen, jedoch konnte nach der Gabe des A II-Antagonisten (B_1) eine signifikante Korrelation dieser beiden Komponenten festgestellt werden (Abb. 24). Mit ansteigender PAsEa wurde auch der diast. RR höher. Auch in diesem

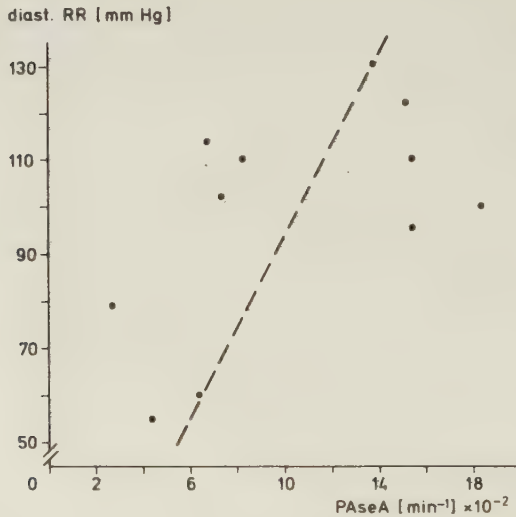


Abb. 24: Beziehung zwischen Plasma-Angiotensinase-Aktivität und diastolischem Blutdruck bei Saralasin-behandelten Ratten (Gruppe B_1).
Abszisse: Plasma-Angiotensinase-Aktivität (PAsEa) in min^{-1} ; Ordinate: diastolischer Blutdruck (RR) in mmHg.

Fall ist eine Wirkung zwischen der PAsEa und dem Saralasin denkbar. Da Saralasin signifikant den diast. RR senkt und die Angiotensinasen als unspezifische Peptidasen auch den A II-Antagonisten abbauen sollten, wäre die Zunahme des diast. RR mit ansteigender PAsEa denkbar.

Die Abb. 25 zeigt das Verhalten der GAsEa bei steigendem Körpergewicht. Es besteht hier eine signifikante Korrelation ($p = 0,05$); mit ansteigendem Gewicht bzw. Alter der Tiere steigt die GAsEa, wie auch bei den Kontrollratten als Tendenz (ohne Signifikanz) zu beobachten war. Daraus läßt sich

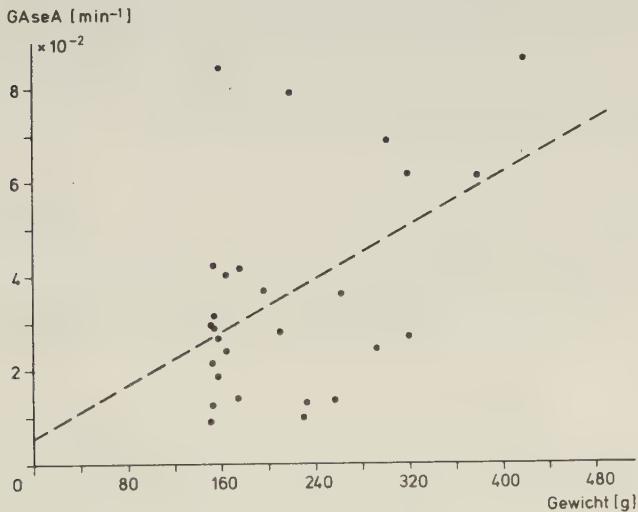


Abb. 25: Beziehung zwischen Gewicht und glomerulärer Angiotensinase-Aktivität bei Saralasin-behandelten Ratten (Gruppen A und B₁).
Abszisse: Gewicht in g; Ordinate: glomeruläre Angiotensinase-Aktivität (GAsEa) in min^{-1} .

schließen, daß mit zunehmendem Gewicht die Angiotensinase-Aktivität im Glomerulus zunimmt, während die Plasma-Angiotensinase-Aktivität abnimmt. Da auch bei den Kontrollratten die GaseA mit zunehmendem Gewicht einen Anstieg andeutete, ist wahrscheinlich nicht die Wirkung des Saralasin dafür verantwortlich.

Die GaseA nach Saralasininfusion bei der Gruppe B war, wie auch bei den Normalratten, unabhängig von der PRA.

Für die Abhängigkeit der GaseA von der PRC konnte nur nach der Saralasingabe (Gruppe A) eine signifikante Korrelation ermittelt werden (Abb. 26), jedoch ist der Abfall der Geraden nur gering ausgebildet.

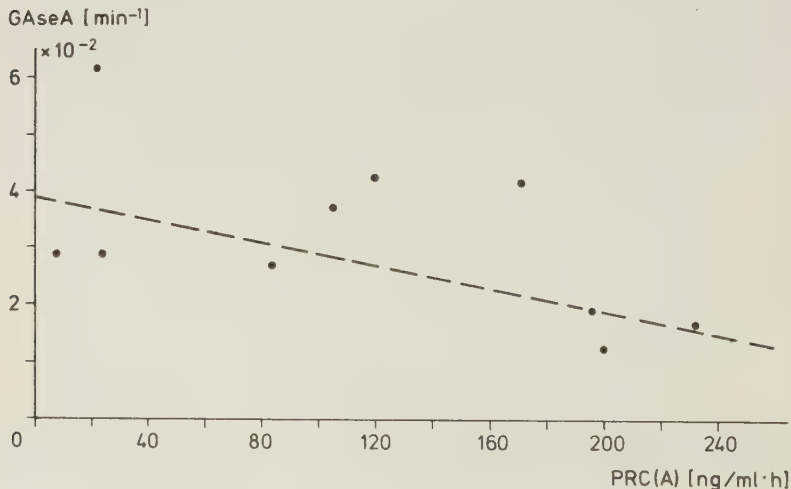


Abb. 26: Beziehung zwischen Plasma-Renin,"konzentration" und glomerulärer Angiotensinase-Aktivität bei Saralasin-behandelten Ratten (Gruppe A).
Abszisse: Plasma-Renin,"konzentration" (PRC) in ng/ml·h; Ordinate: glomeruläre Angiotensinase-Aktivität (GaseA) in min⁻¹.

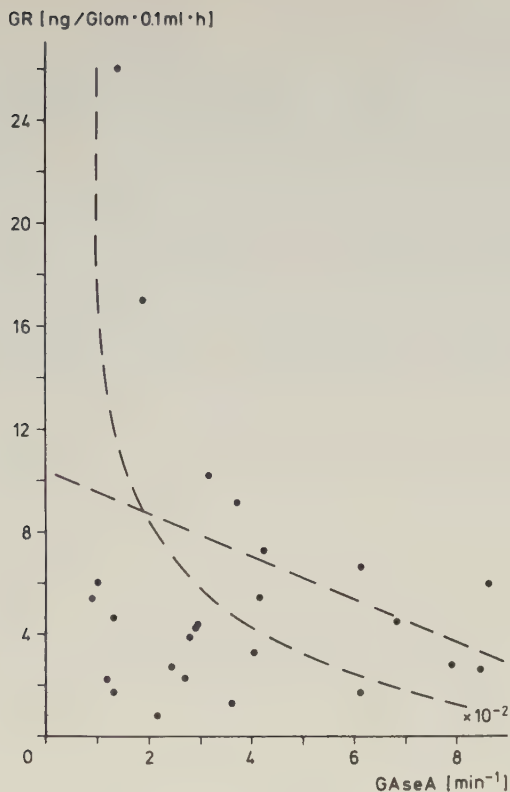


Abb. 27: Beziehung zwischen glomerulärer Angiotensinase-Aktivität und glomerulärem Reningehalt bei Saralasin-behandelten Ratten (Gruppen A und B₁). Abszisse: glomeruläre Angiotensinase-Aktivität (GaseA) in min⁻¹; Ordinate: glomerulärer Reningehalt (GR) in ng/Glom.·0,1 ml·h.

Die Beziehung GR zu GaseA ergab, wie aus Abb. 27 zu entnehmen ist, ein ähnliches Verhalten (einen hyperbelartigen, vielleicht auch linearen Abfall) wie bei den Normalratten. Auch in diesem Fall ist die mögliche Wechselwirkung zwischen beiden Größen wohl nicht Saralasin-bedingt.

Die GaseA war, wie auch bei den Normalratten, vom diast. RR unabhängig.

III. Das Plasma- und glomeruläre RAS bei Ratten mit
genetisch bedingtem Hochdruck:

Orientierend wurden verschiedene Komponenten des Plasma- und glomerulären RAS an Ratten mit genetisch bedingtem spontanen Hochdruck (spontaneously hypertensive rats, SHR) des Okamoto-Stammes untersucht. Ziel dieser Untersuchungen war es, signifikante Unterschiede zu den von uns verwendeten normotonen Ratten herauszufinden, um für künftige Arbeiten einen Anhalt darüber zu haben, ob eine dieser Komponenten in einen näheren Zusammenhang zu dieser Hochdruckform zu bringen ist.

An 14 (7♂, 7♀) Ratten vom Okamoto-Stamm (SHR, 125-300 g Gewicht) wurden nachfolgend zusammengefaßte Messungen durchgeführt, deren Einzelwerte der Tabelle XVI zu entnehmen sind. Die statistische Auswertung dieser Meßwerte zeigte folgende Ergebnisse:

Gewicht	g	$199,4 \pm 53,0$	n = 14
PRA	ng/ml·h	$43,4 \pm 45,1$	n = 13
PRC	ng/ml·h	$99,5 \pm 94,8$	n = 13
PCEA	μmol/ml·h	$2,97 \pm 1,5$	n = 14
GR	ng/Glom.·h	$5,2 \pm 7,0$	n = 14
GCEA	μmol/Glom.·h	$0,0242 \pm 0,0305$	n = 13
GAseA	min ⁻¹	$0,0289 \pm 0,008$	n = 14
mittl.syst.RR	mmHg	$154,1 \pm 32,7$	n = 13
mittl.diast.RR	mmHg	$145,2 \pm 30,5$	n = 13

Die PRA erwies sich als signifikant höher (2p= 0,02) als bei den normalen Ratten. Es muß jedoch darauf hingewiesen

Tabelle XVI

Messungen bei Hochdruckratten

Nr.	Gewicht [g]	PRA [ng/ml·h]	PRC [ng/ml·h]	PCEA [μmol/ml·h]	GCEA [μmol/Glom·h]	GR [ng/Glom·h]	GaseA [min ⁻¹]	Syst.RR [mmHg]	Diast.RR [mmHg]
1	300	10,08	7,71	5,25	----	0,41	0,0360	---	---
2	228	30,56	124,26	5,28	0,0180	5,66	0,0270	110	100
3	163	70,56	322,9	4,29	0,0090	1,34	0,036	134	127
4	163	65,10	252,97	2,96	0,0097	3,87	0,021	157	150
5	125	29,4	111,06	3,84	0,0108	3,67	0,022	158	150
6	128	163,0	120,95	3,84	0,0136	5,82	0,021	163	154
7	202	75,8	59,25	1,04	0,0208	1,42	0,020	127	122
8	186	67,0	77,86	1,17	0,0232	1,66	0,024	150	145
9	295	5,27	23,76	0,97	0,0430	3,01	0,029	220	200
10	201	3,96	11,0	1,03	0,0460	27,76	0,042	142	137
11	212	---	---	2,78	0,0020	0,78	0,044	182	170
12	206	11,88	42,68	2,26	0,0017	2,12	0,028	187	175
13	155	27,28	114,4	3,3	0,0023	5,44	0,022	173	167
14	227	4,2	25,06	3,5	0,1140	10,4	0,033	100	90

werden, daß diese zur Kontrolle herangezogene Rattengruppe schlecht mit dem Okamoto-Stamm vergleichbar ist, und es besser geeignete Tiere gibt, die uns jedoch nicht zur Verfügung standen. Dennoch ist die mittlere PRA mit 43,3 ng/ml·h sicherlich als deutlich erhöht anzusehen, auch wenn man mit Kontrollwerten anderer Autoren vergleicht; jedoch ist dabei zu berücksichtigen, daß aufgrund unserer reaktionskinetischen Messungen der anfänglichen A I-Bildung höhere Werte zu erwarten sind.

Die PRC war in statistischer Auffälligkeit ($p = 0,05$) höher als bei den normotonen Ratten.

Vergleicht man das Verhältnis PRC/PRA, so ist dieses bei den Hochdruckratten deutlich niedriger als bei unserer normotonen Kontrollgruppe. Leider konnte bei den Hochdruckratten keine PRSC bestimmt werden. Da die PRA sowohl ein Maß für den Plasma-Reningehalt als auch für die PRSC ist, könnte man daraus schließen, daß bei den Hochdruckratten die Angiotensinogen-Konzentrationen höher sind als z.B. bei den mit Saralasin behandelten Ratten, bei denen auch erhöhte Plasma-Reninwerte festgestellt wurden. Möglicherweise wird nur bei der akuten, kurzzeitigen Saralasinapplikation die Reninsubstratkonzentration gesenkt, während der erhöhte Plasma-Reningehalt bei den Hochdruckratten diese Wirkung nicht hat.

Die PCEA unterschied sich nicht von den an den normotonen Ratten gemessenen Werten, sondern es bestand eher eine gute Übereinstimmung.

Die mittlere GR war dagegen deutlich niedriger, wenn auch keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden konnten. Allgemein sind die Fehlerbreiten der GR-Werte recht hoch. Dieses ist wahrscheinlich auf eine biologische Streuung zurückzuführen. Wahrscheinlich hat der GR eine Funktion für das einzelne Nephron, so daß daher schon eine höhere Streuung zu erwarten ist.

Wie bei den Saralasin-behandelten Tieren sind die mittleren GR-Gehalte bei erhöhten Plasma-Reninwerten niedriger als bei unseren Kontrolltieren. Dieses könnte dadurch verursacht worden sein, daß eine verstärkte Renin-Ausschüttung, die zu einem erhöhten Plasmaspiegel führt, die Verminderung des GR-Gehalts bewirkt, d.h. die Syntheseleistung der einzelnen Zellen kommt nicht nach.

Die GCEA-Werte entsprachen recht gut den Kontrollwerten.

Die GaseA jedoch war in statistischer Auffälligkeit ($p = 0,05$) höher als bei den normotonen Ratten. Aus den gemessenen glomerulären Enzymaktivitäten könnte man schließen, daß die lokale A II-Bildung sich nicht wesentlich von der unserer Kontrollratten unterscheidet, denn bei einer unveränderten Converting enzyme-Aktivität wird eine leichte Erhöhung der Reninaktivität durch den Anstieg der Angiotensinase zumindest z.T. kompensiert.

Hochsignifikant größer ($2p < 0,001$) als bei den normotonen Ratten waren mittlerer syst. und diast. Blutdruck.

Das Verhalten der RAS-Komponenten zueinander bei Hochdruckratten wurde in Trendanalyse und Regressionsrechnung untersucht. Die Beziehungen der einzelnen RAS-Komponenten zueinander unterschieden sich nicht im wesentlichen von denen bei den normotonen Ratten.

Zusammenfassend ist ein Vergleich zwischen den normotonen Kontrollratten, den Saralasin-behandelten Ratten und den SH-Ratten in Abb. 28 dargestellt.

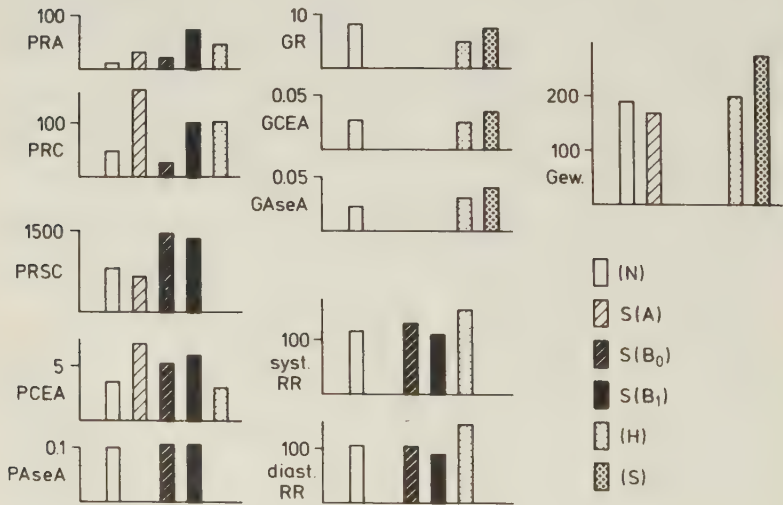


Abb. 28: Vergleich der Ergebnisse: Normotone (Kontroll-)Ratten, Saralasin-behandelte Ratten und SH-Ratten.
(N) = normotone Ratten
S(A) = Saralasin-behandelte Ratten Gruppe A
S(B₀) = Saralasin-behandelte Ratten Gruppe B₀
S(B₁) = Saralasin-behandelte Ratten Gruppe B₁
(H) = SH-Ratten
(S) = Saralasin-behandelte Ratten der Gruppen A + B₁

IV. _Schlußbemerkung

Beim Vergleich der vorliegenden Meßergebnisse mit denen anderer Autoren ist in jedem Fall zu berücksichtigen, daß von uns versucht wurde, die Enzymaktivitäten durch die anfängliche (Reaktions-)Geschwindigkeit der Bildung eines Reaktionsproduktes zu erfassen. Dieses führte sicherlich dazu, daß in unserem Fall höhere Werte als bei den anderen Autoren ermittelt wurden. Um den Einfluß störender Komponenten weitgehend auszuschalten, haben wir außerdem so empfindlich wie möglich gemessen, was eine starke Verdünnung der Proben erforderte.

Der beabsichtigte Vergleich der glomerulären Enzymaktivitäten mit den Plasma-Werten wurde dadurch erschwert, daß die glomerulären Ergebnisse relativ weit gestreut waren, was wahrscheinlich biologisch bedingt ist.

Deutliche Veränderungen der Plasma-Werte waren im Einzelfall kaum in den Glomeruli erkennbar. Da neuerdings eine Aktivierung des Renins angenommen wird (38,57,60,69), muß auch berücksichtigt werden, daß mit den glomerulären Werten möglicherweise auch die weniger oder nicht aktive Vorstufe dieses Enzyms miterfaßt wird. Es ist auch denkbar, daß während der renalen Reninfreisetzung eine Aktivierung des Enzyms erfolgt. Zur Aufklärung dieser Zusammenhänge scheint es erforderlich zu sein, den chemischen und auch physiologischen Mechanismus der Renin-Aktivierung zu untersuchen. Wahrscheinlich spielen diese Vorgänge bei den diskutierten Untersuchungen eine nicht vernachlässigbare Rolle.

D. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Aktivitäten bzw. Konzentrationen des glomerulären Renin-Angiotensin-Systems (RAS) mit dem des Plasmas an der Ratte zu vergleichen. Das wurde unter Kontrollbedingungen und nach einer Stimulierung des Systems mit dem Angiotensin II-Antagonisten Saralasin untersucht. Außerdem wurden die genannten Größen an unbehandelten Ratten mit genetisch bedingtem spontanem Bluthochdruck (Okamoto-Zucht) gemessen. Zur Bestimmung der Plasma-Reninaktivität (PRA), der Plasma-Reninkonzentration (PRC) und der Plasma-Reninsubstratkonzentration (PRSC) diente der Angiotensin I-Radioimmunoassay. Die glomeruläre Reninaktivität (GR) und die Angiotensinase-Aktivitäten wurden mit dem Angiotensin-Rattentest, die Converting enzyme-Aktivitäten fluorimetrisch nach Piquilloud et al.(47,48) unter Verwendung des synthetischen Converting enzyme-Substrates Z-Phe-His-Leu bestimmt. Die i.v. Applikation des Angiotensin II-Antagonisten verursachte signifikante Anstiege der PRA ($2p < 0,01$), der PRC ($2p = 0,01$) und der PCEA ($2p < 0,05$) und einen signifikanten Abfall der PRSC ($2p = 0,01$). Daneben kam es zu einer statistisch auffälligen Erhöhung der glomerulären Angiotensinase-Aktivität ($2p = 0,05$). Der systolische ($2p = 0,025$) und besonders der diastolische Blutdruck ($2p = 0,005$) wurden signifikant gesenkt.

Bei den unbehandelten Ratten mit genetisch bedingtem spontanem Hochdruck waren PRA ($2p = 0,02$), PRC ($p = 0,05$)

und GaseA ($p = 0,05$) beim Vergleich mit unseren Kontrollwerten signifikant bzw. statistisch auffällig erhöht. Für die im Mittel niedrigeren GR-Werte dieser Tiere konnte jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt werden.

Das gegenseitig abhängige Verhalten der verschiedenen Meßwerte wurde mit Hilfe einer Trendanalyse und Regressionsrechnung untersucht. Eine signifikante Korrelation konnte zwischen PRA und GCEA unter Kontrollbedingungen nachgewiesen werden, die durch die Einwirkung des Angiotensin II-Antagonisten aufgehoben wurde. Für die Beziehungen GCEA/PCEA, GR/PRC, GR/GCEA und GR/GaseA konnte keine lineare Korrelation festgestellt werden, jedoch sind diese Parameter wahrscheinlich nichtlinear miteinander verknüpft. Bei den Saralasin-behandelten Tieren korrelierten PAsA/PRA und PAsA/PRC. Die ermittelten Ergebnisse lassen es als wahrscheinlich erscheinen, daß neben dem „kurzen Feedback-Mechanismus“ (Beeinflussung der renalen Reninfreisetzung durch Angiotensin II) weitere Wechselwirkungen zwischen den Komponenten des glomerulären und Plasma-RAS bestehen.

E. Literatur

1. Atlas, S.A., J.E. Sealey, J.H. Laragh:
"Acid"- and "Cryo"-Activated Inactive Plasma Renin.
Circ. Res. 43 (Suppl. 1), I128-I133 (1978)
2. Barrett, J.D., P. Eggena, M.P. Sambhi:
Evidence for a "prorenin convertase" in rat plasma:
effects of nephrectomy and acute renin stimulation.
American Heart Assoc., The Council for High Blood
Pressure Research, Ann. Fall Conf., Cleveland (1978)
3. Bunag, R.D., Y. Kaneko, A.J. Vander, J.W. McCubbin:
Control of renin release.
In: "Renal Hypertension", ed. by I.H. Page, J.W.
McCubbin [Year Book Medical Publishers, Inc., Chicago],
p. 100 (1968)
4. Brubacher, E.S., A.J. Vander:
Sodium deprivation and renin secretion in unanesthe-
tized dogs.
Am. J. Physiol. 214, 15 (1968)
5. Dahlheim, H., P. Weber, K. Thureau:
Anreicherung des Renin-Substrats im Schweineserum und
Anwendung in einer Mikro-Renin-Bestimmung.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 294(3), R31 (1967)
6. Dahlheim, H., P. Weber, K. Thureau:
Untersuchungen über die Reaktionsgeschwindigkeit der
enzymatischen Angiotensinbildung in vitro in Abhängig-
keit von der elektrolytischen Zusammensetzung des
Inkubationsmediums.
Pflügers Arch. 310, 137 (1969)

7. Dahlheim, H., P. Weber, K. Petschauer, K. Thureau:
Das enzymatische Bildungs- und Abbauverhalten des
Angiotensins in Abhängigkeit von der Zusammensetzung
des Inkubationsmediums.
In: „Aktuelle Probleme des Elektrolyt- und Wasserhaus-
haltes - Nierenbiopsie“, Hrsg. G. Watschinger, Verlag
der Wiener Medizinischen Akademie, Wien, p. 637 (1969)
8. Dahlheim, H., P. Weber, P. Walter, J. Rosenthal:
Vergleichende reaktionskinetische Untersuchungen mit
standardisiertem menschlichen Renin an vier angerei-
cherten tierischen Reninsubstraten.
Pflügers Arch. 317, 344 (1970)
9. Dahlheim, H., P. Granger, K. Thureau:
A Sensitive Method for Determination of Renin Activity
in the Single Juxtaglomerular Apparatus of the Rat
Kidney.
Pflügers Arch. 321, 303-315 (1970)
10. Dahlheim, H.:
Die Analyse von Enzymaktivitäten des Renin-Angiotensin-
systems in einzelnen juxtaglomerulären Apparaten der
Rattenniere.
In: „Biochemische Aspekte der Nierenfunktion“, M. Hohen-
egger (Hrsg.), Goldmann-Verlag, München, S. 173-180 (1972)
11. Dahlheim, H., E. Schmidmeier:
Determination and Characterization of Angiotensinase
Activity of Microdissected Juxtaglomerular Apparatuses
of the Rat Kidney.
Vth Int. Congr. Nephrol., Mexico, p. 119 (1972)
12. Dahlheim, H., H. Schweisfurth:
Does the Kidney Contain its Own Angiotensin I Convert-
ing Enzyme ?
Pflügers Arch. 359 (Suppl.), 125 (1975)

13. Dahlheim, H.:
Persönliche Mitteilungen.
14. Davis, J.O.:
The control of aldosterone secretion.
Physiologist 5, 65 (1962)
15. Davis, J.O.:
What signals the kidney to release renin ?
Circ. Res. 28, 301 (1971)
16. Davis, J.O.:
The control of renin release.
Am. J. Med. 55, 333-350 (1973)
17. Eisenbach, G.M., J.B. Van Liew:
Effect of angiotensin on glomerular filtration of
albumin.
II. Nephrol. Symposium, Hannover (1974)
18. Farrell, G., A.N. Taylor:
Neuroendocrine aspects of blood volume regulation.
Ann. Rev. Physiol. 24, 471 (1962)
19. Feldberg, W., G.P. Lewis:
The action of peptides on the adrenal medulla. Release
of adrenaline by bradykinin and angiotensin.
J. Physiol. 171, 98 (1964)
20. Feldberg, W., G.P. Lewis:
Further studies on the effects of peptides on the
suprarenal medulla of cats.
J. Physiol. 178, 239 (1965)

21. Filous, G.:
Untersuchung der Reninfreisetzung an überströmten
mikrodissezierten Glomeruli des Kaninchens.
Diss. Univ. München (1980)
22. Flamenbaum, W., R.J. Hamburger:
Superficial and deep juxtaglomerular apparatus renin
activity of the rat kidney. Effect of surgical pre-
paration and sodium chloride intake.
J. Clin. Investig. 54, 1373-1381 (1974)
23. Fowler, N.O., J.C. Holmes:
Coronary and myocardial actions of angiotensin.
Circ. Res. 14, 191 (1964)
24. Gauer, O.H., J.P. Henry:
Circulatory basis of fluid volume control.
Physiol. Rev. 43, 423 (1963)
25. Genest, J., E. Koiw, W. Nowaczynski, T. Sandor:
Study of urinary adrenocortical hormones in human
arterial hypertension.
Acta Endocrinol. Suppl. 51, 173
26. Gillies, A., T. Morgan:
Renin content of individual juxtaglomerular apparatuses
and the effect of diet, changes in nephron flow rate
and in vitro acidification on the renin content.
Pflügers Arch. 375, 105-110 (1978)
27. Goormaghtigh, N.:
La fonction endocrine des artérioles rénales; Son rôle
dans la pathogénie de l'hypertension artérielle.
Rév. Belge Sci. Méd. 16, 65 (1945a)

28. Goormaghtigh, N.:
Facts in favor of an endocrine function of the renal arterioles.
J. Pathol. Bacteriol. 57, 392 (1945b)
29. Gross, F.:
Renin und Hypertensin, physiologische oder pathologische Wirkstoffe ?
Klin. Wochenschr. 36, 693 (1958)
30. Gross, F., K.D. Bock:
Some contributions to the pharmacology of synthetic angiotensin.
Circulation 25, 193 (1962)
31. Gross, F., H. Brunner, M. Ziegler:
Renin-angiotensin system, aldosterone and sodium balance.
Recent Progr. Hormone Res. 21, 119 (1965)
32. Gross, F., P.A. Khairallah, J.C. McGiff, R.D. Bunag:
Pharmacology of angiotensin.
In: „Renal Hypertension“, Year Book Medical Publishers, ed. by I.H. Page, J.W. McCubbin, p. 134, Chicago (1968)
33. Haas, E., H. Lamfrom, H. Goldblatt:
Isolation and purification of hog renin.
Arch. Biochem. Biophys. 42, 368 (1953)
34. Haas, E., H. Goldblatt, E.C. Gipson, L. Lewis:
Extraction, purification, and assay of human renin free of angiotensinase.
Circ. Res. 19, 739 (1966)

35. Hartroft, P.M.:
Electron microscopy of nerve endings associated with
juxtaglomerular cells and macula densa.
Lab. Investig. 15, 1127 (1966)
36. Kiil, F.:
Autoregulation of extracellular volume.
Scandinav. J. Clin. Lab. Investig. 25, 113 (1970)
37. Klaus, D., R. Rössler:
Die Regulation der Reninsekretion. I. Ein neues Modell
für die intra- und extrarenale Wirkung des Renins.
Med. Welt 24, 1352-1355 (1973)
38. Kotchen, T.A., W.J. Welch, R. Talwalker:
Mechanism of acid activation and cryoactivation of
plasma renin.
American Heart Assoc., The Council for High Blood
Pressure Research, Ann. Fall Conf., Cleveland (1978)
39. Kuschinsky, G., H. Lüllmann:
Über die Wirkung von synthetischem Hypertensin auf
Kammer- und Vorhofmuskulatur der Katze.
Klin. Wochenschr. 37, 928 (1959)
40. Laragh, J.H., P.J. Cannon, R.P. Ames:
Interaction between aldosterone secretion, sodium and
potassium balance, and angiotensin activity in man:
studies in hypertension and cirrhosis.
Canad. Med. Assoc. J. 90, 248-256 (1964)
41. Malvano, R., G.C. Zucchelli, D. Gasser, V. Bartolini:
Problems connected with the analytical blank in PRA
measurements by A I RIA.
Clin. Chim. Acta 50, 161-171 (1974)

42. Meier, R., F. Gross, J. Tripod, H. Turrian:
Pharmakologische Charakterisierung von synthetischem
Hypertensin.
Experientia 13, 361 (1957)

43. Menard, J., K.J. Catt:
Measurement of Renin Activity, Concentration and
Substrate in Rat Plasma by RIA of A I.
Endocrinol. 90(2), 422-430 (1972)

44. Millar, J.A., B.J. Leckie, P.F. Semple, J.J. Morton,
S. Sonkodi, J.I.S. Robertson:
Active and Inactive Renin in Human Plasma: Renin
Arteriovenous Differences and Relationships with
Angiotensin and Renin-Substrate.
Circ. Res. 43 (Suppl. 1), I120-I127 (1978)

45. Mouw, D., J.P. Bonjour, R.L. Malvin, A.J. Vander:
Central action of angiotensin in stimulating ADH
release.
Am. J. Physiol. 220, 239 (1971)

46. Mulrow, P.J., W.F. Ganong, G. Cora, A. Kuljian:
The nature of the aldosterone stimulating factor in
dog kidneys.
J. Clin. Investig. 41, 505 (1962)

47. Ochwaldt, B., H.D. Lowitz, K.O. Stumpe:
Influence of angiotensin on tubular function studied
by micropuncture techniques in the rat.
Proc. IVth Int. Congr. Nephrol., Stockholm (1966)

48. Page, L.B., E. Dessaulles, S. Lagg, E. Haber:
Interference with immunoassays of angiotensin-I and
angiotensin-II by proteins in human plasma.
Clin. Chim. Acta 34, 55-62 (1971)

49. Palaic, D.:
Effect of angiotensin on noradrenaline- ^3H accumulation
and synthesis in vitro.
Canad. J. Physiol. Pharmacol. 49, 495 (1971)
50. Panisset, J.C.:
Effect of angiotensin on the release of acetylcholine
from preganglionic and postganglionic nerve endings.
Canad. J. Physiol. Pharmacol. 45, 313 (1967)
51. Peach, M.J., W.H. Cline, D.T. Watts:
Release of adrenal catecholamines by angiotensin II.
Circ. Res. 19, 571 (1966)
52. Persson, A.E.G., R. Müller-Suur, G. Selén:
Capillary oncotic pressure as a modifier for tubulo-
glomerular feedback.
Am. J. Physiol. 236, F97-F102 (1979)
53. Piquilloud, Y., A. Reinharz, M. Roth:
Action de l'enzyme de conversion ("converting enzyme")
sur des substrats synthétiques.
Helv. Physiol. Acta 26, CR231 (1968)
54. Piquilloud, Y., A. Reinharz, M. Roth:
Studies on the Angiotensin Converting Enzyme with
Different Substrates.
Biochim. Biophys. Acta 206, 136-142 (1970)
55. Sachs, L.:
Statistische Auswertungsmethoden.
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 2.A. (1969)

56. Schweisfurth, H., H. Dahlheim:
Determination of Tissue Converting Enzyme and Renal
Iso-converting Enzyme Activity.
In: "Radioimmunoassay - Renin - Angiotensin", ed. by
D.K. Krause, W. Hummerich, K. Poulsen, Georg Thieme
Publ.s, Stuttgart, pp. 71-75 (1978)
57. Sealey, J.E., S.A. Atlas, J.H. Laragh, N.B. Oza,
J.W. Ryan:
Human urinary kallikrein converts inactive to active
renin: a possible physiological activator of renin.
American Heart Assoc., The Council for High Blood
Pressure Research, Ann. Fall Conf., Cleveland (1978)
58. Siegenthaler, W.:
Klinische Pathophysiologie.
Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart, S. 574 ff. (1973)
59. Skinner, S.L., J.W. McCubbin, I.H. Page:
Control of renin secretion.
Circ. Res. 15, 64 (1964)
60. Skinner, S.L., C.I. Johnston:
Persönliche Mitteilungen.
61. Smith, H.W.:
Salt and water volume receptors.
Am. J. Med. 23, 623 (1957)
62. Stamey, T.A.:
Renovascular hypertension.
Am. J. Med. 38, 829 (1965)
63. Steven, K.:
Effect of peritubular infusion of angiotensin II
on rat proximal nephron function.
Kidney Int. 6, 73 (1974)

64. Thurau, K.:
Fundamentals of renal circulation.
Proc. IInd Int. Congr. Nephrol., Prague (1963),
[Excerpta Med. Int. Congr. Ser. 78, 51-61]
65. Thurau, K.:
Renal Hemodynamics.
Am. J. Med. 36(5), 698-719 (1964)
66. Thurau, K., J. Schnermann:
Die Natriumkonzentration an den Macula densa-Zellen
als regulierender Faktor für das Glomerulumfiltrat.
Klin. Wochenschr. 43, 140 (1965)
67. Thurau, K., J. Schnermann, W. Nagel, M. Horster,
M. Wahl:
Composition of tubular fluid in the macula densa
segment as a factor regulating the function of the
juxtaglomerular apparatus.
Circ. Res. 21(Suppl. II), II-79 (1967)
68. Thurau, K., H. Dahlheim, P. Granger:
On the local formation of angiotensin at the site of
the juxtaglomerular apparatus.
Proc. IVth Int. Congr. Nephrol. Stockholm 1969, vol. 2,
Karger Verlag, Basel, pp. 24-30 (1970)
69. Thurau, K., H. Dahlheim, A. Grüner, J. Mason,
P. Granger:
Activation of renin in the single JGA by sodium
chloride in the tubular fluid at the macula densa.
Circ. Res. 30/31(Suppl. II), 182-186 (1972)
70. Thurau, K.:
Modification of angiotensin-mediated tubulo-glomerular
feedback by extracellular volume.
Kidney Int. 8, S202-S207 (1975)

71. Tobian, L., A. Tombouliau, J. Janacek:
Effect of high perfusion pressures on the granulation
of juxtaglomerular cells in an isolated kidney.
J. Clin. Investig. 38, 605 (1959)
72. Tobian, L.:
Interrelationship of electrolytes, juxtaglomerular
cells and hypertension.
Physiol. Rev. 40, 280 (1960)
73. Tobian, L.:
Physiology of the juxtaglomerular cells.
Ann. Int. Med. 52(2), 395 (1960)
74. Tobian, L.:
Relationship of juxtaglomerular apparatus to renin
and angiotensin.
Circulation 25, 189 (1962)
75. Tobian, L.:
Renin release and its role in renal function and the
control of salt balance and arterial pressure.
Fed. Proc. 26, 48 (1967)
76. Ueda, H., H. Tagawa, M. Ishii, Y. Kaneko:
Effect of renal denervation on release and content of
renin in anesthetized dogs.
Jap. Heart J. 8, 156 (1967)
77. Vander, A.J., R. Miller:
Control of renin secretion in the anesthetized dog.
Am. J. Physiol. 207, 537 (1964)
78. Vander, A.J.:
Effect of catecholamines and the renal nerves on renin
secretion in anesthetized dogs.
Am. J. Physiol. 209, 659 (1965)

79. Vander, A.J.:
Control of renin release.
Physiol. Rev. 47, 359-382 (1967)
80. Vander, A.J., J. Carlson:
Mechanism of the effects of furosemide on renin
secretion in anesthetized dogs.
Circ. Res. 25, 145 (1969)
81. Wernze, H.:
Persönliche Mitteilung.
82. Wright, F.S., J.P. Briggs:
Feedback Control of Glomerular Blood Flow, Pressure,
and Filtration Rate.
Physiol. Rev. 59(4), 958-1006 (1979)

Herrn Prof. Dr. H. Dahlheim danke ich für die Überlassung des Themas und das ständige Interesse an dieser Arbeit.

Ebenso bedanke ich mich bei seinen technischen Mitarbeitern für ihre Mithilfe und wirksame Assistenz in allen labortechnischen Fragen.

Außerdem gilt mein Dank der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Firma Röhm Pharma, Darmstadt, für die wertvolle Unterstützung.

LEBENS LAUF

Am 9.12.1952 wurde ich in Istanbul (Türkei) als Tochter des Kaufmanns Lazar Salama und seiner Ehefrau, geb. Arditì, geboren. Meine Eltern siedelten nach München über, wo ich ab 1958 die Französische Schule bis zum Eintritt in das Sophie-Scholl-Gymnasium (1963) besuchte. Im Jahre 1966 wechselte ich zum mathematisch-wissenschaftlichen Willi-Graf-Gymnasium. Wegen meiner regelmäßig hervorragenden Leistungen war es mir möglich, die 10. Klasse zu überspringen.

Nach bestandenem Abitur (1971) erhielt ich zum Wintersemester 71/72 an der Ludwig-Maximilians-Universität München einen Studienplatz für das Fach Humanmedizin. Das Vorphysikum bestand ich im Oktober 1972, das Physikum im Oktober 1973.

Gemäß der Approbationsordnung für Ärzte habe ich im September 1974 den 1., im März 1977 den 2. und im April 1978 den 3. Teil des Staatsexamens abgelegt. Im Juni 1978 erhielt ich die Approbation als Ärztin.

Bereits nach dem Physikum begann ich bei Prof. Dr. H. Dahlheim im Physiologischen Institut der Universität München auf dem Gebiet des Renin-Angiotensin-Systems wissenschaftlich zu arbeiten und befaßte mich hauptsächlich mit dem Angiotensin-Nachweis mit Hilfe der Radioimmunoassay-Technik. Bald darauf begann ich mit dem experimentellen Teil meiner Doktorarbeit.

Von Juni 1978 bis April 1979 war ich als wissenschaftliche Mitarbeiterin bei Herrn Prof. Dr. H. Dahlheim tätig.

Seit Mai 1979 bin ich als Assistenzärztin im Kinderkrankenhaus St. Marien in Landshut beschäftigt.

